



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/85, A61K 48/00, 39/12, 39/29</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 95/11307</b> <b>(43) Date de publication internationale: 27 avril 1995 (27.04.95)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR94/00483 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 27 avril 1994 (27.04.94) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 93/12659 22 octobre 1993 (22.10.93) FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). UNIVERSITÉ D'OTTAWA [CA/CA]; 115 Séraphin Marion, Ottawa, Ontario (CA). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> DAVIS, Heather, Lynn [CA/CA]; 33 Willard Avenue, Ottawa, Ontario (CA). WHALEN, Robert, Gerald [US/FR]; 332, rue Lecourbe, F-75015 Paris (FR). MICHEL, Marie-Louise [FR/FR]; 9, passage du Mont-Cenis, F-75018 Paris (FR). <b>(74) Mandataire:</b> MICHELET, Alain; Cabinet Harlé & Phelip, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avec une indication relative à un micro-organisme déposé, qui en vertu de la règle 13bis, n'a pas été donnée en même temps que la description mais séparément</i> <i>Date de réception par le bureau international:</i> 20 juin 1994 (20.06.94)
<b>(54) Title:</b> NUCLEOTIDE VECTOR, COMPOSITION CONTAINING SUCH VECTOR AND VACCINE FOR IMMUNIZATION AGAINST HEPATITIS <b>(54) Titre:</b> VECTEUR NUCLEOTIDIQUE, COMPOSITION LE CONTENANT ET VACCIN POUR L'IMMUNISATION A L'ENCONTRE D'UNE HEPATITE <b>(57) Abstract</b> <p>Nucleotide vector comprising at least one gene or one complementary DNA coding for at least a portion of a protein of a virus, and a promoter providing for the expression of such gene in muscle cells. The gene may be the S gene of the hepatitis B virus. A vaccine preparation containing said bare DNA is injected into the host previously treated with a substance capable of inducing a coagulating necrosis of the muscle fibers.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Vecteur nucléotidique comprenant au moins un gène ou un ADN complémentaire codant pour au moins une partie d'une protéine d'un virus, et un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires. Le gène peut être le gène S du virus de l'hépatite B. Une préparation vaccinale contenant cet ADN nu est injectée à l'hôte préalablement prétraité par une substance capable d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

VECTEUR NUCLEOTIDIQUE, COMPOSITION LE CONTENANT ET  
VACCIN POUR L'IMMUNISATION A L'ENCONTRE D'UNE  
HEPATITE.

5 La présente demande a pour objet un vecteur  
pour l'immunisation à l'encontre d'une hépatite.

Elle est en outre relative à une composition  
contenant ce vecteur .

10 L'immunisation par injection d'ADN nu dans les  
tissus musculaires a fait l'objet de plusieurs travaux  
depuis le début des années 1990.

15 Ainsi, ULMER et al. ( Science, 259, 1745-1749,  
1993) ont obtenu une protection à l'encontre du virus  
Influenza par induction des lymphocytes T cytotoxiques  
en injectant dans des quadriceps de souris un plasmide  
codant pour la nucléoprotéine Influenza A. Le plasmide  
utilisé porte soit le promoteur du virus du sarcome de  
Rous soit le promoteur du cytomégalo virus.

20 RAZ et al. ( Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90,  
4523-4527, 1993) ont injecté des vecteurs comprenant  
le promoteur du virus du sarcome de Rous et un gène  
codant pour l'interleukine-2, l'interleukine-4 ou le  
facteur de croissance transformant de type  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ).  
Les réponses immunitaires humorale et cellulaire, des  
souris auxquelles ont été administrés par voie  
25 intramusculaire ces plasmides, sont améliorées.

30 WANG et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA,  
90,4156-4160, 1993), ont injecté dans les muscles de  
souris un plasmide portant un gène codant pour la  
protéine d'enveloppe du virus HIV-1. L'injection des  
plasmides a été précédée par un traitement par de la  
bupivacaine au même endroit dans le muscle. Les  
auteurs mettent en évidence la présence d'anticorps  
capables de neutraliser l'infection par le virus HIV-  
1. On remarquera néanmoins que l'ADN a été injecté

deux fois par semaine pour un nombre total de quatre injections.

5 DAVIS et al. ( Compte-Rendu du 28ème Congrès Européen sur le muscle, Bielefeld, Allemagne, 21-25 Septembre 1992) ont injecté des plasmides portant un gène codant pour la luciférase ou la  $\beta$ -galactosidase en prétraitant les muscles par du sucrose ou une cardiotoxine. Les auteurs observent l'expression de la luciférase ou de la  $\beta$ -galactosidase.

10 Plus récemment, un article paru dans Science et Avenir (Septembre 1993, pages 22-25) indique que WHALEN et DAVIS ont réussi à immuniser des souris contre le virus de l'hépatite B en leur injectant de l'ADN pur du virus dans les muscles. Une injection  
15 préalable de toxine de venin de serpent suivie de l'injection d'ADN 5 à 10 jours plus tard est citée de manière générale. Il est précisé que cette méthode n'est pas pratique.

20 Ces travaux avaient été précédés par d'autres expérimentations dans lesquelles différents ADN avaient été injectés, en particulier dans des tissus musculaires. Ainsi, la demande PCT/US 90/01 515 (publiée sous le n° WO-90/11 092) divulgue diverses constructions plasmidiques pouvant être injectées, en  
25 particulier dans des tissus musculaires pour le traitement de la dystrophie musculaire. Néanmoins, ce document précise que l'ADN est préférentiellement injecté dans des liposomes.

30 Il en est de même du brevet canadien CA 362.966 (publié sous le n° 1.169.793) qui décrit l'injection intramusculaire de liposomes contenant de l'ADN codant en particulier pour les antigènes HBs et HBc. Les résultats décrits dans ce brevet mentionnent l'expression d'antigènes HBs. La présence d'anticorps

anti-HBs n'a pas été recherchée.

La demande Internationale PCT/FR 92/00 898 (publiée sous le n° WO-93/06 223) décrit des vecteurs viraux pouvant être acheminés par la voie sanguine jusqu'à des cellules cibles. Ces vecteurs sont ainsi reconnus par les récepteurs de cellules, telles que des cellules musculaires et peuvent être employés dans le traitement de la dystrophie musculaire ou de la thrombose.

Cette demande ne concerne pas l'immunisation à l'encontre de virus tels que par exemple celui de l'hépatite B.

Il ressort donc de l'état de la technique citée que, si l'on connaissait déjà des techniques d'immunisation à l'encontre de l'hépatite par injection d'ADN nu, celles-ci présentaient un grand nombre d'inconvénients ne les rendant pas pratiques à mettre en oeuvre.

D'autre part, l'ADN nu utilisé pour vacciner des souris était l'ADN pur du virus. Ce type de traitement n'est pas envisageable pour la vaccination humaine, du fait des risques qu'il fait courir aux patients.

Enfin, les expérimentations plus anciennes dans lesquelles l'ADN injecté est contenu dans des liposomes n'ont pas démontré de réponse immunitaire.

Le demandeur s'est donc attaché à trouver de nouvelles constructions de vecteurs permettant d'immuniser à l'encontre de l'hépatite tout en n'ayant pas de conséquences négatives pour la santé humaine.

Il s'est d'autre part attaché à trouver un additif à des compositions contenant ces constructions permettant une dégénérescence efficace du tissu musculaire avant l'injection de l'ADN, et compatible

avec les impératifs de la santé humaine.

Le demandeur a montré de manière surprenante que l'on pouvait obtenir un niveau d'anticorps efficace et durable largement supérieur au niveau permettant d'obtenir chez l'homme une protection immunitaire efficace et durable à l'encontre de l'infection par le virus de l'hépatite en administrant par injection intramusculaire un vecteur ayant une construction définie, et une substance capable d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires.

La présente demande a donc pour objet un vecteur nucléotidique comprenant au moins :

- un gène ou un ADN complémentaire codant pour au moins une partie d'une protéine de virus, et
- un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires.

Ledit vecteur peut ne pas se répliquer dans ces cellules .

Il peut aussi être répliatif ce qui permet d'obtenir un nombre élevé de copies par cellule et d'améliorer la réponse immunitaire.

Le vecteur est en outre choisi afin d'éviter son intégration au sein de l'ADN cellulaire, de telles intégrations étant connues pour activer les oncogènes et induire la cancérisation des cellules.

Le vecteur selon la présente invention est avantageusement un plasmide en partie d'origine bactérienne et portant notamment une origine de répliation bactérienne et un gène permettant sa sélection, tel qu'un gène de résistance à un antibiotique.

Ce vecteur peut être aussi pourvu d'une origine de répliation lui permettant de se répliquer dans les



cellules musculaires de son hôte, telle qu'une origine de répllication du virus du papillome bovin.

5 Le gène ou l'ADN complémentaire compris dans ce vecteur code avantageusement pour une protéine de structure d'un virus mais il peut aussi coder pour une protéine régulatrice.

10 Le gène ou l'ADN complémentaire porté par ce vecteur peut coder pour au moins une partie d'une protéine du virus d'une hépatite en particulier de l'hépatite B et préférentiellement la protéine HBs, sous l'une de ses formes S, S-préS2 ou S-préS2-préS1, auquel cas le gène est le gène S.

15 Le virus peut aussi être responsable d'une autre hépatite telle qu'une hépatite A ou qu'une hépatite non-A, non-B, telle qu'une hépatite C, E ou delta.

Les séquences des gènes ou des protéines des virus de ces hépatites sont décrites ou peuvent être déduites des documents suivants :

20 brevet FR-79 21 811, brevet FR 80.09.039, brevet EP-81.400.634, brevet FR 84.03.564, brevet EP 91.830.479 et article de Najarian et al. ( Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2627-2631).

25 Le vecteur peut aussi comprendre des gènes codant au moins en partie pour la protéine gp160 du virus HIV1 associée à la protéine p25, et/ou à la protéine p55, et/ou à la protéine p18 ou au moins un gène codant pour la protéine Rev du virus HIV1.

30 Le vecteur peut aussi comprendre au lieu d'une protéine d'un virus, une protéine d'un microorganisme pathogène tel qu'une protéine de la bactérie responsable de la diphtérie, de la coqueluche, d'une listériose , la toxine du tétanos etc...

Le promoteur porté par ce vecteur est avantageusement le promoteur du cytomégalo virus (CMV). Il peut néanmoins être tout autre promoteur permettant une expression efficace du gène dans les cellules musculaires.

Il peut ainsi être :

- un promoteur interne ou endogène, c'est-à-dire un promoteur du virus dont est issu le gène; un tel promoteur peut être complété par un élément régulateur du muscle ou d'un autre tissu, en particulier un élément activateur,

- un promoteur d'un gène d'une protéine du cytosquelette, en particulier de la desmine tel que décrit par BOLMONT et al. (Journal of submicroscopic cytology and pathology, 1990, 22, 117-122) et ZHENLIN et al. (Gene, 1989, 78, 243-254).

- le promoteur des gènes de surface du virus HBV.

De manière générale, le promoteur peut être hétérologue à l'hôte, c'est-à-dire qu'il n'est pas trouvé chez l'hôte de manière naturelle, mais il est avantageusement homologue, tout en étant actif à l'origine dans un tissu autre que le tissu musculaire.

Outre le promoteur, le vecteur peut comprendre une séquence de terminaison de la transcription, située en aval du gène.

Un tel vecteur peut être le plasmide pCMV/HBS, ou pRCCMV-HBS, ayant la séquence SEQ ID N°1, déposé sous le N°I-1370 auprès de la Collection Nationale de Cultures des Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM) le 21 Octobre 1993.

Il peut aussi être le plasmide pRSV/HBS déposé sous le n°I-1371 auprès de la CNCM le 21 Octobre 1993..



Ce plasmide est de structure similaire au pCMV/HBS mais comprend le promoteur du virus du Sarcome de Rous (RSV) au lieu du promoteur du cytomégalovirus (CMV).

5 D'autres plasmides peuvent être :

- le pCMVHB-S1.S2.S qui a été construit par insertion du fragment Bgl II-Bgl II du gène S, obtenu à partir du pCP10, dans un vecteur pBlueScript modifié pour contenir des sites de clonage supplémentaires dans la partie "polylinker". Le fragment contenant le gène S a été ensuite enlevé par digestion KpnI-BssH II puis cloné dans les sites correspondants du pcDNA 3 (In vitrogen, Rad Systems Europe Ltd, Abingdon UK) afin d'obtenir le pCMVHB-S1.S2.S. Ce plasmide a été déposé sous le n° I-1411 auprès de la CNCM.

15 - le pCMVHB-S2.S qui a été obtenu en éliminant la partie pré-S1 du gène HBS du pCMVHB-S1.S2.S par digestion KpnI/MstI, puis en liguant, après traitement par de la nucléase S1, les deux extrémités.

20 Le pCMVHB-S2.S a été déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1410.

- le pHBV-S1.S2.S, déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1409, a été obtenu par insertion du fragment Bgl II- Bgl II du gène S, obtenu à partir du pCP10, dans un vecteur pBlueScript modifié pour contenir des sites supplémentaires de clonage dans la partie "polylinker",

25 - le pBS-SKT-S1.S2.S, code pour les trois protéines d'enveloppe S, S-préS<sub>1</sub> et S-préS<sub>1</sub>-préS<sub>2</sub> du virus HBV.

30

La présente invention est en outre relative à des séquences nucléotidiques comprenant un promoteur homologue à l'hôte et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN complémentaire

codant pour une des protéines citées ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet un vaccin ou un médicament contenant au moins un vecteur, ou une séquence nucléotidique, tel que défini ci-dessus.

Elle a de plus pour objet une composition capable d'induire une réponse cytotoxique constituée par au moins une séquence nucléotidique exprimée dans les cellules musculaires et comportant un promoteur tel que défini ci-dessus.

Elle est encore relative à une composition pharmaceutique non lipidique destinée à l'immunisation à l'encontre d'une infection virale telle qu'une hépatite comprenant au moins d'une part une substance capable d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires et d'autre part un vecteur tel que décrit ci-dessus ou comportant une des séquences nucléotidiques telles que décrites ci-dessus complètes ou partielles. On entend par séquence partielle ou séquence codant pour au moins 6 acides aminés.

Avantageusement ladite substance est la bupivacaine.

D'une manière avantageuse, ladite composition est caractérisée en ce que le vecteur est administré dans le muscle de l'individu à immuniser, au minimum 5 jours après l'administration de la bupivacaine, et sensiblement au même endroit.

Une telle pré-administration de bupivacaine permet de manière surprenante d'augmenter l'efficacité de l'administration du vecteur ainsi que l'immunisation de l'individu.

Avantageusement, le vecteur est administré dix jours après administration de la bupivacaine, et sensiblement au même endroit dans le muscle de

l'individu.

La présente composition peut en outre contenir des adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

5 Une telle composition est préférentiellement administrée par injection intramusculaire. L'injection peut être effectuée à l'aide d'une seringue affectée à cet usage mais aussi à l'aide d'un pistolet à jet liquide tel que celui décrit par FURTH et al. ( 1992, 10 Anal. Biochem.205, 365-368).

Les quantités de bupivacaine nécessaires pour obtenir une dégénérescence suffisante du tissu musculaire afin d'obtenir une immunisation optimale sont de l'ordre de 0,10 mg à 10mg par dose de 15 composition injectable.

Les quantités de vecteurs à injecter afin d'obtenir une immunisation optimale de l'individu à l'encontre d'une hépatite varient en fonction de la protéine codée par le gène porté par le vecteur. A 20 titre indicatif, on injectera entre 0,1 et 1000 µg de vecteurs par individu.

Les vecteurs pourront être obtenus par les méthodes connues de l'homme du métier, en particulier par synthèse ou par les méthodes du génie génétique.

25 De telles méthodes sont celles décrites en particulier dans le manuel technique :

Maniatis T. et al. 1982 - Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor - Ed. New York.

30 La présente invention est illustrée sans aucunement être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels :

La figure 1 est une représentation schématique du plasmide pRC/CMV-HBs.

— Les figures 2A à 2D sont des représentations

schématiques respectivement des plasmides pCMVHB-S, pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S et pHBV-S1.S2.S

Les figures 3, 4 et 5 sont des cartes de restriction schématiques respectivement des plasmides pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S et pRSV-HBS.

La figure 6 illustre la sécrétion de particules antigéniques HBs (HBs Ag) en ng/ml (en ordonnée) en fonction du nombre de jours ( en abscisse ) par des cellules portant les plasmides pCMVHB-S, pCMVHB-S1.S2.S, pHBV-S1.S2.S, pSVS ou pCMVHB-S2.S

Les figures 7A et 7B illustrent la mise en évidence sur certaines particules de la figure 6 des antigènes préS<sub>1</sub> et PréS<sub>2</sub> par respectivement des anticorps anti-préS<sub>1</sub> et anti-préS<sub>2</sub>. La formation des complexes anticorps-antigène est mise en évidence par la densité optique (en ordonnée), en fonction de la concentration en antigène.

Les figures 8A à 8D représentent les réponses anti-HBS (HBs Ab en ordonnée, exprimée en mUI/ml) et anti-préS<sub>2</sub> (preS<sub>2</sub> Ab en ordonnée, exprimée en D.O.) de souris vaccinées par respectivement le pCMVHB-S (8A), le pCMVHB-S2.S (8B), le pCMVHB-S1.S2.S (8C) et le pHBV-S1.S2.S (8D).

La figure 9 illustre la réponse anticorps, immunoglobulines Ig G et IgM ( titres en ordonnée), d'une souris vaccinée par le pCMVHB-S2.S en fonction du nombre de semaines (en abscisse).

Les figures 10A à 10C représentent les réponses anti-groupe et anti-sous type ay induites par de l'ADN de pCMV-S (ADN) ou de l'antigène HBS (prot), respectivement chez des souris B10 (10A), B10S (10B) et B10M (10C).

Les figures 10D à 10F représentent les réponses anti-groupe a induites par de l'ADN de pCMV-S (ADN) ou

de l'antigène HBS (prot), respectivement chez des souris B10 (10D), B10S (10E) et B10M (10F).

La figure 11 représente une carte linéaire de restriction du plasmide pBS-SKT-S1.S2.S.

5 EXEMPLE 1 :

Induction d'anticorps à l'encontre d'un antigène de surface de l'hépatite B par injection séquentielle de bupivacaine et d'un plasmide portant un gène codant pour l'antigène.

10 1) Matériels et méthodes

1.1 Prétraitement par la bupivacaine.

Toutes les expérimentations ont été effectuées sur les muscles du tibia antérieur ( TA) de souris C57BL/6J âgées de 5 à 7 semaines.

15 Un cycle unique de dégénération et de régénération des fibres musculaires est induit dans les muscles du tibia antérieur de souris non anesthésiées, par injection intramusculaire de 50  $\mu$ l de marcaïne (bupivacaine 0,5 %, DMSO 1%) commercialisée par les Laboratoires Astra, France. La  
20 solution est injectée en utilisant une seringue à tuberculose et une aiguille insérée dans un manchon de polyéthylène, afin de limiter la pénétration à une profondeur de 2 mm.

25 La marcaïne étant un anesthésique, les injections dans les jambes droite et gauche sont espacées de 10 à 30 minutes afin d'éviter un surdosage.

1.2. Préparation de l'ADN

30 Le plasmide utilisé a été construit par clonage dans un vecteur pBluescript modifié du fragment de restriction Xho I-Bgl II du plasmide pCP10 qui contient le gène codant pour l'antigène de surface HBS et des séquences non traduites en amont et en aval

incluant le signal de poly-adénylation.

Le gène S a été ensuite récupéré par digestion à l'aide des enzymes KpnI-BssHII et le fragment a été cloné dans le site du vecteur pRC/CMV commercialisé par In Vitrogen. La construction plasmidique finale a  
5 été appelée pCMV-HBS et a été déposée sous le n°I-1370 auprès de la CNCM.

Ce plasmide est représenté schématiquement sur la figure 1. Le promoteur CMV est situé entre le  
10 nucléotide 228 qui est le site de coupure de la MluI et le nucléotide 896, qui est le site de coupure de la KpnI. Le fragment d'ADN comprenant le gène de structure de l'antigène HBs a été cloné entre les nucléotides 896 et 2852 ( site de la BssH III).

15 Le gène HBs s'étend entre les nucléotides 911 (site XhoI) et 2768 (site Bgl II).

La séquence complète de ce plasmide est la séquence SEQ ID N°1.

20 L'ADN plasmidique purifié a été préparé par les méthodes standard, redissous dans du tampon PBS et stocké à -20°C jusqu'à l'injection.

### 1.3 Injection de l'ADN

Un à cinq jours après injection de la marcaïne, on a injecté au même endroit l'ADN, la souris étant  
25 anesthésiée à l'aide de pentobarbital de sodium (75mg/kg voie intrapéritonéale ).

La solution d'ADN qui contient 50 µg d'ADN plasmidique et 50 µl de tampon PBS a été injectée à travers la peau dans les muscles en cours de  
30 régénération du tibia antérieur par une injection unique intramusculaire.

Des injections ont été effectuées de manière bilatérale, dans les deux pattes des souris, chaque animal recevant ainsi au total 100µg d'ADN plasmidique



recombinant. Comme pour l'injection de la marcaïne, on injecte la solution d'ADN en utilisant la seringue à tuberculose et l'aiguille précédemment décrite.

5 Dans chaque patte on a effectué une seule injection intramusculaire d'ADN.

## 2. Résultats

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I ci-après .

10 Ils montrent de manière très claire que l'injection d'ADN après traitement par la marcaïne permet d'obtenir des taux importants d'anticorps sériques à l'encontre de l'antigène de surface de l'hépatite B.

15 Ces résultats sont surprenants, l'analyse de l'état de la technique ne permettant pas de supposer qu'un plasmide permettrait l'induction d'anticorps-anti-HBs pouvant être retrouvés dans le sérum et permettant ainsi une vaccination efficace.

20 La facilité de mise en oeuvre de la vaccination par des plasmides, et le fait qu'il ne soit pas nécessaire de faire des rappels, permet d'envisager une vaccination à grande échelle.

### EXEMPLE 2 :

25 Comparaison de l'efficacité d'injection d'un plasmide en présence et en absence de lipides.

30 Une dose de 10  $\mu$ g d'ADN plasmidique du vecteur SV40-Luciférase disponible dans le commerce' ("pGL2-Control Vector" de Promega, référence E1 11) dans 50  $\mu$ l de solution physiologique est injectée dans un muscle prétraité avec du sucrose selon la méthode de Davis et al. (Hum. Gene Ther. 4:151-159 (1993)). L'ADN injecté est préalablement mélangé avec des lipides tels que le dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou des mélanges suivants : DOGS + spermidine, et DOGS +

polyéthylèneglycol (PEG). L'activité de la luciférase est mesurée 5 jours après l'injection.

Ces résultats figurent dans le tableau II ci-après.

5           Ils montrent que la présence de lipides (DOGS) diminue de manière très importante l'efficacité d'injection du plasmide par rapport à une composition sans lipides (témoin).

10    EXEMPLE 3:

Comparaison des réponses de souris et de lapins à l'encontre de plasmides portant divers promoteurs et gènes d'enveloppe du virus HBV.

15           Quatre plasmides ont été construits permettant l'expression de une, deux ou trois protéines d'enveloppe du virus HBV. Dans trois des constructions (pCMVHB-S, pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S) les gènes codant pour les protéines d'enveloppe du virus HBV sont placés sous le contrôle transcriptionnel du  
20   promoteur des gènes précoces du virus CMV ( figure 1, figure 2 A à 2C , figures 3 et 4). Le quatrième plasmide (pHBV-S1.S2.S) utilise comme élément de contrôle transcriptionnel le promoteur des gènes de surface du virus HBV contenu dans la région pré-S1 de  
25   ce virus (Cattaneo et al. (1983) Nature, 305, 336) (figure 2D). Dans les quatre constructions, le signal de polyadénylation utilisé est contenu dans les séquences HBV présentes en 3' du gène S.

30    1. Contrôle in vitro de l'efficacité des vecteurs.

          Pour contrôler l'efficacité de ces vecteurs in vitro dans des cellules eucaryotes, des fibroblastes ou des myoblastes de souris ont été transfectés. Un plasmide exprimant les trois protéines d'enveloppe  
35   sous contrôle du promoteur SV40 (pSVS) a été utilisé

comme contrôle (Michel et al. 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7708-7712)). La figure 6 montre la cinétique de sécrétion des particules HBs dans les surnageants de culture. Les faibles taux d'antigène produits par transfection du vecteur pCMVHB-S1.S2.S sont compatibles avec une forte synthèse de la grande protéine d'enveloppe à partir du promoteur CMV. Cette protéine étant myristillée dans sa partie amino-terminale, est retenue dans le réticulum endoplasmique (Ganem, (1991), Current Topics in Microbiology and Immunology, 168, 61-83). La rétention dans la cellule de protéines portant des déterminants pré-S1 a été confirmée par immunofluorescence.

La composition des particules sécrétées a été analysées dans un système ELISA sandwich utilisant comme anticorps de capture un anticorps monoclonal de souris spécifique des déterminants pré-S1 (figure 7A) ou pré-S2 (figure 7B) et comme second anticorps un sérum polyclonal de lapin anti-HBs. Ces expériences montrent que les particules d'AgHBs produites à partir du vecteur pCMVHB-S1.S2.S portent des déterminants pré-S1 et pré-S2 signant la présence de la grande et de la moyenne protéine d'enveloppe du virus HBV. Les particules sécrétées après transfection du vecteur pCMVHB-S2.S et pHBV-S1.S2.S portent, en plus des déterminants Hbs, des déterminants pré-S2 caractéristiques de la protéine moyenne d'enveloppe.

## 2) Inoculation de l'ADN

L'ADN purifié sur colonne Quiagen a été injecté par voie intramusculaire en une seule injection de 100µg (50 µg/patte) dans le muscle antérieur du tibia de souris C57/BL6 (8 souris par groupe). Cinq jours avant l'injection, le muscle a été prétraité par la cardiotoxine afin d'induire une dégénération suivie

d'une régénération des cellules musculaires favorisant ainsi la capture de l'ADN par ces cellules.

Des expériences d'injection de l'ADN ont été également réalisées chez le lapin. Dans ce cas l'ADN pCMVHB-S a été administré dans le muscle normal sans 5 dégénération, soit au moyen d'un pistolet d'injection sans aiguille le Biojector<sup>R</sup>, soit au moyen de seringues conventionnelles munies d'aiguilles.

10 3) Réponses anti-HBs des souris vaccinées par l'ADN

Une réponse anticorps anti-HBs est induite par une seule injection de l'un ou l'autre des quatre plasmides utilisés.

La réponse anticorps a été analysée au moyen de 15 kit commerciaux de détection des anticorps anti-HBs (Monolisa anti-HBs, Diagnostic Pasteur). Les anticorps anti-préS2 sont détectés dans un système ELISA utilisant sur la phase solide un peptide de la région pré-S2 (AA 120-145) correspondant à l'épitope B majeur 20 porté par ce domaine (Neurath et al., (1985), Nature, 315, 154).

Les figures 8A à 8D montrent la cinétique de la réponse anti-HBs (HBs-Ab) exprimée en milli-unités internationales/ml et de la réponse anti-pré-S2 25 (préS2Ab) mesurée en densité optique (492 nm) pour des sérums dilués au 1/100. La révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps anti-immunoglobuline (IgG) de souris marqué à la peroxydase.

L'injection du plasmide pCMVHB-S (figure 8A) 30 induit une synthèse constante des anticorps anti-HBs. La séroconversion est obtenue chez 100% des souris dès une semaine après l'injection avec un taux moyen d'anticorps de 48 mUI/ml (de 12 à 84 mUI/ml, écart-type (SD) =28), ce qui est 4 à 5 fois supérieur au

seuil requis chez l'homme pour conférer la protection (10 mUI/ml).

La réponse induite par une seule injection du plasmide pCMVHB-S2.S (figure 8B) se caractérise par l'apparition très précoce d'anticorps anti-HBs. Ces anticorps atteignent un taux moyen de 439 mUI/ml (de 104 à 835 mUI/ml; SD = 227) à une semaine puis diminuent pour réaugmenter et atteindre à 13 semaines le taux initial. La signification de ce pic d'anticorps sera discutée plus loin. Un pic d'anticorps IgG anti-pré-S2 est observé à deux semaines.

L'apparition des anticorps anti-HBs induits par l'injection des plasmides pCMVHB-S1.S2.S (figure 8C) et pHBV-S1.S2.S (figure 8D) est légèrement retardée puisque les souris ne séroconvertissent à 100 % qu'à partir de deux semaines. Le profil de la séroconversion est identique, il est caractérisé par une réponse initiale spécifique de l'antigène pré-S2 suivie d'une réponse anti-HBs augmentant graduellement pour atteindre des taux de 488 mUI/ml (de 91 à 1034 mUI/ml; SD=552) (pCMVHB-S1.S2.S) et 1725 mUI/ml (de 143 à 6037 mUI/ml; SD=1808) (pHBV-S1.S2.S) à 13 semaines.

#### 4) Réponse anti-HBs des lapins vaccinés par l'ADN.

Les résultats présentés sur les tableaux III et IV montrent que les taux d'anticorps détectés à 8 semaines chez les lapins immunisés au Biojector sont significativement supérieurs à ceux obtenus par injection de l'ADN à l'aiguille.

#### 5. Analyse qualitative de la réponse humorale.

Des systèmes ELISA portant sur la phase solide des antigènes HBs de compositions variées vis-à-vis

des déterminants présentés et utilisant comme second anticorps des anticorps spécifiques des IgM ou des IgG de souris ont permis d'analyser qualitativement la réponse anticorps obtenue.

5            Dans tous les cas, l'injection unique de l'ADN chez la souris se caractérise par l'apparition précoce d'IgM spécifiques de l'AgHBs suivie immédiatement par la conversion en anticorps d'isotypes IgG caractéristiques de la réponse mémoire induite avec  
10 l'aide des cellules T auxiliaires. La réponse anticorps à l'injection de l'ADN se caractérise par sa précocité. En effet, la séroconversion est obtenue 8 à 15 jours après l'injection selon le type d'ADN utilisé et dans tous les cas le plateau est atteint en quatre  
15 semaines et maintenu de façon soutenue pendant 12 semaines.

          L'utilisation d'antigène HBs de sous type hétérologue (ad) fixé sur les plaques ELISA permet de mettre en évidence la présence, dans le sérum des  
20 souris immunisées, d'anticorps spécifiques de groupe anti-a, et par différence de réactivité vis-à-vis d'AgHBs de même sous-type (ay), d'anticorps spécifiques de sous-type anti-y. La présence des anticorps spécifiques des déterminants de groupe de  
25 l'AgHBs est très importante puisque ceux-ci sont capables de conférer la protection contre des virus de sous-type hétérologues lors d'épreuves virulentes chez le chimpanzé (Szmuness et al. (1982) N. Engl. J. Med. 307, 1481-1486).

30            L'analyse de la réponse induite par le vecteur pCMV-S2.S montre que celle-ci présente une remarquable similitude avec celle que l'on peut observer chez l'homme au cours de l'infection. Elle est caractérisée par un pic d'IgM spécifiques de la région pré-S2



extrêmement précoce (8 jours) immédiatement suivi par une conversion en IgG anti-pré-S2 ( figure 9). Cette réponse est suivie par l'apparition des anticorps anti-HBs IgM puis IgG. La production des anticorps anti-HBs est constante et atteint un maximum à 4 semaines. A 13 semaines des IgG anti-HBs et anti-pré-S2 persistent à un niveau constant.

La réponse anti-sous-type (y) précède la réponse anti-groupe (a) de la même manière que cela a été décrit lors de la vaccination avec le vaccin recombinant (Tron et al., (1989) (J. Infect. Dis.160, 199-204).

La réponse obtenue avec les trois autres ADN vaccin montre la commutation de classe IgM → IgG caractéristique de la réponse secondaire. La réponse étant d'abord dirigée contre le sous-type avant de l'être contre les déterminants de groupe de l'AgHBs.

La réponse à long terme, étudiée pour l'ADN pCMVHB-S, montre que le pic d'anticorps est atteint en 3 mois et que ceux-ci persistent à taux égal 6 mois plus tard (Tableau V).

#### 6) Vaccin génétique et non réponse

Un problème majeur de la vaccination contre l'hépatite B reste le nombre élevé de non-répondeurs à la vaccination classique (2,5 à 5%) . La non réponse chez l'homme a pu être corrélée à certains types HLA (Krustall et al., (1992) J. Exp. Med. 175, 495-502) et à un défaut de la présentation de l'antigène ou de la stimulation des cellules T auxiliaires.

Pour étudier l'impact possible de la vaccination génétique sur la non réponse à l'AgHBs , un panel de souches de souris dont la réponse aux différentes protéines d'enveloppe du virus HBV est régulée génétiquement et a été bien caractérisée par

Millich et Coll. ( 1986 J. Immunol. 137, 315) a été utilisé. La construction pCMVHB-S précédemment décrite a été injectée dans les muscles des souris B10(H-2<sup>b</sup>)B10.S (H-2<sup>S</sup>) et B10.M (H-2<sup>f</sup>).

5           La souche B10 répond aux trois protéines d'enveloppe du virus, la souche B10.S ne répond pas à l'AgHBs mais la non-réponse peut être contournée par immunisation avec des antigènes HBsAg portant des déterminants pré-S2. La souche B10M est totalement non  
10           répondeuse à l'antigène HBs et à l'antigène pré-S2. Une réponse dans cette souche a pu être obtenue par immunisation avec des AgHBs portant des déterminants pré-S1.

          Les souris immunisées par l'ADN ont reçu une  
15           seule injection (100 µg) dans le muscle en régénération. Les souris témoins ont reçu la protéine en deux injections intrapéritonéales à un mois d'intervalle, la première de 2 µg AgHBs adjuvé en adjuvant complet de Freund (CFA) et la seconde de 2 µg  
20           AgHBs adjuvé en adjuvant incomplet de Freund (IFA).

          Les résultats obtenus avec l'ADN pCMVHB-S sont illustrés par les figures 10A à 10F.

          - Dans la souche B10 (bonne répondeuse) la  
25           réponse induite par l'ADN est plus précoce que la réponse induite par la protéine après une seule injection.

          - Dans la souche B10S ( non répondeuse à  
30           l'AgHBs en l'absence de pré-S2) on observe l'apparition d'anticorps anti-HBs spécifiques de sous-type puis spécifiques de groupe après immunisation par l'ADN pCMVHB-S. Des anticorps anti-HBs spécifiques de groupe ne sont obtenus chez les souris immunisées avec la protéine HBs qu'après la 2ème injection.

          - Dans la souche B10M ( non répondeuse à

l'AgHBs en l'absence de pré-S1) l'immunisation par l'ADN permet d'obtenir une réponse anti-HBs spécifique de groupe et de sous-type alors que la protéine induit une réponse de sous-type seulement et nécessite deux injections.

La réponse induite par les trois types de vecteurs est comparée dans les trois souches de souris.

#### CONCLUSION

Il est généralement admis que la réponse humorale à l'antigène HBs est suffisante à elle seule pour conférer la protection. La présence d'anticorps dirigés contre d'autres déterminants (pré-S1 et pré-S2) portés par les protéines d'enveloppe du virus, eux-mêmes protecteurs, pourrait améliorer la qualité de cette réponse. L'ensemble des expériences rapportées ici montre que la réponse humorale induite par la vaccination génétique anti-hépatite B est dans plusieurs domaines supérieure à celle qui peut être obtenue par la vaccination classique.

En termes de taux de séroconversion: le taux de 100% est obtenu dès 8 jours pour les souris immunisées avec les ADN pCMV-HBs et pCMVHB-S2.S et cela après une seule injection.

En termes de niveau de réponse: le seuil de 10 mUI/ML considéré suffisant chez l'homme pour conférer la protection est toujours largement dépassé.

En termes de précocité de la réponse: le vecteur pCMVHB-S2.S permet d'obtenir en 8 jours un niveau très élevé d'anticorps anti-pré-S2 et l'on sait que ceux-ci sont capables, à eux seuls, de conférer la protection (Itoh et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9174-9178).

En termes de persistance de la réponse: les

anticorps anti-HBs persistent à un niveau élevé pendant plus de 6 mois.

5 En, termes de qualité de la réponse: les anticorps obtenus sont de type IgG caractéristiques d'une réponse dépendante de cellules T auxiliaires et donc d'une réponse mémoire.

10 En termes d'activité anti-virale: les anticorps sont spécifiques du sous-type viral mais surtout spécifiques de groupe et donc susceptibles de conférer une protection croisée.

15 En termes de signification biologique: le profil de la réponse obtenue par immunisation avec pCMVHB-S2.S mime complètement celui que l'on peut observer, chez l'homme, lors d'une infection virale résolue.

TABLERAU I  
Induction d'anticorps à l'encontre de l'antigène de surface de l'hépatite B.

Description	Nombre de souris	Taux d'anticorps à l'encontre de l'antigène de surface de l'hépatite B dans le sérum (mIU/ml)		
		avant l'injection d'ADN	15 jours après l'injection d'ADN	35 jours après l'injection d'ADN
ADN injecté 1 jour après le traitement par la marcaine	5	0	moyenne: 56 de 5 à plus de 140	moyenne: 59
ADN injecté 5 jours après le traitement par la marcaine	5	0	moyenne : 71 de 21 à plus de 108	moyenne : 47

TABLEAU II

Groupe	RLU/sec/muscle de Luciférase (Moyenne $\pm$ SEM) RLU = Unité de Lumière Relative	Pourcentage par rapport au témoin
Témoin	43 082 $\pm$ 5 419	100 %
4X DOGS	28 $\pm$ 7	0,06 %
DOGS -Spermidine	50 $\pm$ 23	0,12 %
PEG-DOGS	0 $\pm$ 0	0,00 %



TABEAU III  
Immunisation au Biojector<sup>R</sup>

pCMV-HB.S			
N°	0 semaine	2 semaines	8 semaines
2.1	0	517	380
2.2	0	374	322
3.1	0	258	418
4.1	0	400	4045
4.2	0	88	86
4.3	0	314	420
6.1	0	415	1001
6.2	0	1543	3517
6.3	0	1181	141
Moyenne	0	566 mUI/ml	1148mUI/ml
SD	0	476	1521
SEM	0	159	507
N	9	9	9
CV		84%	133%

TABLEAU IV  
Immunisation par injection à l'aide d'une aiguille

pCMV-HB.S			
N°	0 semaine	2 semaines	8 semaines
1.1	1	0	1
5.1	0	287	186
5.2	0	162	798
5.3	0	305	203
7.1	0	86	175
7.2	0	1108	mort
moyenne	0	325 mUI/ML	273 mUI/ml
SD	0	401	305
SEM	0	164	136
N	6	6	5
CV	245%	124%	112%

TABLEAU V  
Réponse à long terme d'une souris vaccinée par le pCMVHB-S

	1 mois	2 mois	3 mois	6 mois
* Titre a-HBs en mUI/ml	227	662	1299	1082
* Titre a-HBs ELISA	$3,5.10^{-4}$	$5.10^{-4}$	$8.5.10^{-4}$	$9.10^{-4}$

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT PASTEUR
- (B) RUE: 28, rue du Docteur Roux
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75724

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Vecteur nucleotidique, composition le contenant et vaccin pour l'immunisation a l'encontre d'une hepatite

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5618 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: circulaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (vi) ORIGINE:

- (B) SOUCHE: pRCCMV-HBS

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTCGACTCT	40
CAGTACAATC TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT	80
CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG	120
CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA	160
CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG	200
CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT	240

GATTATTGAC	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	280
ATTAGTTCAT	AGCCCATATA	TGGAGTTCCG	CGTTACATAA	320
CTTACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCTGACCG	CCCAACGACC	360
CCCGCCCAT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT	400
AACGCCAATA	GGGACTTTCC	ATTGACGTCA	ATGGGTGGAC	440
TATTTACGGT	AAACTGCCCA	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT	480
ATCATATGCC	AAGTACGCCC	CCTATTGACG	TCAATGACGG	520
TAAATGGCCC	GCCTGGCATT	ATGCCCAGTA	CATGACCTTA	560
TGGGACTTTC	CTACTTGGCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA	600
TCGCTATTAC	CATGGTGATG	CGGTTTTGGC	AGTACATCAA	640
TGGGCGTGGA	TAGCGGTTTG	ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	680
CTCCACCCCA	TTGACGTCAA	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC	720
AAAATCAACG	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA	ACAAC TCCGC	760
CCCATTGACG	CAAATGGGCG	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG	800
GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA	840
CTGCTTAACT	GGCTTATCGA	AATTAATACG	ACTCACTATA	880
GGGAGACCCA	AGCTTGGTAC	CGGGCCCCCC	CTCGAGGATT	920
GGGGACCCTG	CGCTGAACAT	GGAGAACATC	ACATCAGGAT	960
TCCTAGGACC	CCTTCTCGTG	TTACAGGCGG	GGTTTTTCTT	1000
GTTGACAAGA	ATCCTCACAA	TACCGCAGAG	TCTAGACTCG	1040
TGGTGGACTT	CTCTCAATTT	TCTAGGGGGA	ACTACCGTGT	1080
GTCTTGGCCA	AAATTCGCAG	TCCCCAACCT	CCAATCACTC	1120
ACCAACCTCT	TGTCCTCCAA	CTTGTCCTGG	TTATCGCTGG	1160
ATGTGTCTGC	GGCGTTTTAT	CATCTTCCTC	TTCATCCTGC	1200
TGCTATGCCT	CATCTTCTTG	TTGGTTCTTC	TGGACTATCA	1240
AGGTATGTTG	CCCGTTTGTC	CTCTAATTCC	AGGATCCTCA	1280
ACAACCAGCA	CGGGACCATG	CCGGACCTGC	ATGACTACTG	1320
CTCAAGGAAC	CTCTATGTAT	CCCTCCTGTT	GCTGTACCAA	1360
ACCTTCGGAC	GGAAATTGCA	CCTGTATTCC	CATCCCATCA	1400
TCCTGGGCTT	TCGGAAAATT	CCTATGGGAG	TGGGCCTCAG	1440
CCCGTTTCTC	CTGGCTCAGT	TTACTAGTGC	CATTTGTTCA	1480
GTGGTTCGTA	GGGCTTTCCC	CCACTGTTTG	GCTTTCAGTT	1520
ATATGGATGA	TGTGGTATTG	GGGGCCAAGT	CTGTACAGCA	1560
TCTTGAGTCC	CTTTTTACCG	CTGTTACCAA	TTTTCTTTTG	1600
TCTTTGGGTA	TACATTTAAA	CCCTAACAAA	ACAAAGAGAT	1640

GGGGTTACTC	TCTAAATTTT	ATGGGGTTATG	TCATTGGATG	1680
TTATGGGTCC	TTGCCACAAG	AACACATCAT	ACAAAAAATC	1720
AAAGAATGTT	TTAGAAAAC	TCCTATTAAC	AGGCCTATTG	1760
ATTGGAAAGT	ATGTCAACGA	ATTGTGGGTC	TTTTGGGTTT	1800
TGCTGCCCCCT	TTTACACAAT	GTGGTTATCC	TGCGTTGATG	1840
CCTTTGTATG	CATGTATTCA	ATCTAAGCAG	GCTTTCACCT	1880
TCTCGCCAAC	TTACAAGGCC	TTTCTGTGTA	AACAATACCT	1920
GAACCTTTAC	CCCGTTGCCC	GGCAACGGCC	AGGTCTGTGC	1960
CAAGTGTTTG	CTGACGCAAC	CCCCACTGGC	TGGGGCTTGG	2000
TCATGGGCCA	TCAGCGCATG	CGTGGAACCT	TTTCGGCTCC	2040
TCTGCCGATC	CATACTGCGG	AACTCCTAGC	CGCTTGTTTT	2080
GCTCGCAGCA	GGTCTGGAGC	AAACATTATC	GGGACTGATA	2120
ACTCTGTTGT	CCTATCCCGC	AAATATACAT	CGTTTCCATG	2160
GCTGCTAGGC	TGTGCTGCCA	ACTGGATCCT	GCGCGGGACG	2200
TCCTTTGTTT	ACGTCCCGTC	GGCGCTGAAT	CCTGCGGACG	2240
ACCCTTCTCG	GGGTCGCTTG	GGACTCTCTC	GTCCCCTTCT	2280
CCGTCTGCCG	TTCCGACCGA	CCACGGGGCG	CACCTCTCTT	2320
TACGCGGACT	CCCCGTCTGT	GCCTTCTCAT	CTGCCGGACC	2360
GTGTGCACTT	CGCTTCACCT	CTGCACGTCG	CATGGAGACC	2400
ACCGTGAACG	CCCACCAAAT	ATTGCCCAAG	GTCTTACATA	2440
AGAGGACTCT	TGGACTCTCA	GCAATGTCAA	CGACCGACCT	2480
TGAGGCATAC	TTCAAAGACT	GTTTGTTTAA	AGACTGGGAG	2520
GAGTTGGGGG	AGGAGATTAG	GTTAAAGGTC	TTTGTACTAG	2560
GAGGCTGTAG	GCATAAATTG	GTCTGCGCAC	CAGCACCATG	2600
CAACTTTTTC	ACCTCTGCCT	AATCATCTCT	TGTTTCATGTC	2640
CTACTGTTCA	AGCCTCCAAG	CTGTGCCTTG	GGTGGCTTTG	2680
GGGCATGGAC	ATCGACCCTT	ATAAAGAATT	TGGAGCTACT	2720
GTGGAGTTAC	TCTCGTTTTT	GCCTTCTGAC	TTCTTTCCTT	2760
CAGTACGAGA	TCTGGCCAGG	ATCCACTAGT	TCTAGAGCGG	2800
CCGCCACCGC	GGTGGAGCTC	CAGCTTTTGT	TCCCTTTAGT	2840
GAGGGTTAAT	TGCGCGCATG	CCCGACGGCG	AGGATCTCGT	2880
CGTGACCCAT	GGCGATGCCT	GCTTGCCGAA	TATCATGGTG	2920
GAAAATGGCC	GCTTTTCTGG	ATTCATCGAC	TGTGGCCGGC	2960
TGGGTGTGGC	GGACCGCTAT	CAGGACATAG	CGTTGGCTAC	3000
CCGTGATATT	GCTGAAGAGC	TTGGCGGCGA	ATGGGCTGAC	3040



CGCTTCCTCG	TGCTTTACGG	TATCGCCGCT	CCCGATTTCGC	3080
AGCGCATCGC	CTTCTATCGC	CTTCTTGACG	AGTTCTTCTG	3120
AGCGGGACTC	TGGGGTTCGA	AATGACCGAC	CAAGCGACGC	3160
CCAACCTGCC	ATCACGAGAT	TTCGATTCCA	CCGCCGCCTT	3200
CTATGAAAGG	TTGGGCTTCG	GAATCGTTTT	CCGGGACGCC	3240
GGCTGGATGA	TCCTCCAGCG	CGGGGATCTC	ATGCTGGAGT	3280
TCTTCGCCCA	CCCCAACTTG	TTTATTGCAG	CTTATAATGG	3320
TTACAAATAA	AGCAATAGCA	TCACAAATTT	CACAAATAAA	3360
GCATTTTTTT	CACTGCATTC	TAGTTGTGGT	TTGTCCAAAC	3400
TCATCAATGT	ATCTTATCAT	GTCTGGATCC	CGTCGACCTC	3440
GAGAGCTTGG	CGTAATCATG	GTCATAGCTG	TTTCCTGTGT	3480
GAAATTGTTA	TCCGCTCACA	ATTCCACACA	ACATACGAGC	3520
CGGAAGCATA	AAGTGTAAG	CCTGGGGTGC	CTAATGAGTG	3560
AGCTAACTCA	CATTAATTGC	GTTGCGCTCA	CTGCCCCGCTT	3600
TCCAGTCGGG	AAACCTGTCG	TGCCAGCTGC	ATTAATGAAT	3640
CGGCCAACGC	GCGGGGAGAG	GCGGTTTGCG	TATTGGGCGC	3680
TCTTCCGCTT	CCTCGCTCAC	TGACTCGCTG	CGCTCGGTCG	3720
TTCGGCTGCG	GCGAGCGGTA	TCAGCTCACT	CAAAGGCGGT	3760
AATACGGTTA	TCCACAGAAT	CAGGGGATAA	CGCAGGAAAG	3800
AACATGTGAG	CAAAAGGCCA	GCAAAAGGCC	AGGAACCGTA	3840
AAAAGGCCGC	GTTGCTGGCG	TTTTTCCATA	GGCTCCGCCC	3880
CCCTGACGAG	CATCACAAAA	ATCGACGCTC	AAGTCAGAGG	3920
TGGCGAAACC	CGACAGGACT	ATAAAGATAC	CAGGCGTTTC	3960
CCCCTGGAAG	CTCCCTCGTG	CGCTCTCCTG	TTCCGACCCT	4000
GCCGCTTACC	GGATACCTGT	CCGCCTTTCT	CCCTTCGGGA	4040
AGCGTGGCGC	TTTCTCAATG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	4080
GTTCGGTGTA	GGTCGTTCGC	TCCAAGCTGG	GCTGTGTGCA	4120
CGAACCCCCC	G TTCAGCCCG	ACCGCTGCGC	CTTATCCGGT	4160
AACTATCGTC	TTGAGTCCAA	CCCGGTAAGA	CACGACTTAT	4200
CGCCACTGGC	AGCAGCCACT	GGTAACAGGA	TTAGCAGAGC	4240
GAGGTATGTA	GGCGGTGCTA	CAGAGTTCTT	GAAGTGGTGG	4280
CCTAACTACG	GCTACACTAG	AAGGACAGTA	TTTGGTATCT	4320
GCGCTCTGCT	GAAGCCAGTT	ACCTTCGGAA	AAAGAGTTGG	4360
TAGCTCTTGA	TCCGGCAAAC	AAACCACCGC	TGGTAGCGGT	4400
GGTTTTTTTG	TTTGCAAGCA	GCAGATTACG	CGCAGAAAAA	4440

AAGGATCTCA	AGAAGATCCT	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	4480
TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA	AGGGATTTTG	4520
GTCATGAGAT	TATCAAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	4560
TAAATTAAAA	ATGAAGTTTT	AAATCAATCT	AAAGTATATA	4600
TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG	CTTAATCAGT	4640
GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	4680
TAGTTGCCTG	ACTCCCCGTC	GTGTAGATAA	CTACGATACG	4720
GGAGGGCTTA	CCATCTGGCC	CCAGTGCTGC	AATGATACCG	4760
CGAGACCCAC	GCTCACCGGC	TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	4800
ACCAGCCAGC	CGGAAGGGCC	GAGCGCAGAA	GTGGTCCTGC	4840
AACTTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTAA	TTGTTGCCGG	4880
GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGCGCA	4920
ACGTTGTTGC	CATTGCTACA	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	4960
GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	TCAGCTCCGG	TTCCCAACGA	5000
TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAAG	5040
CGGTTAGCTC	CTTCGGTCCT	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	5080
GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG	5120
CATAATTCTC	TTACTGTCAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	5160
CTGTGACTGG	TGAGTACTCA	ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	5200
GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC	GGCGTCAATA	5240
CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC	5280
TCATCATTGG	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	5320
GATCTTACCG	CTGTTGAGAT	CCAGTTCGAT	GTAACCCACT	5360
CGTGCACCCA	ACTGATCTTC	AGCATCTTTT	ACTTTCACCA	5400
GCGTTTCTGG	GTGAGCAAAA	ACAGGAAGGC	AAAATGCCGC	5440
AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA	CACGGAAATG	TTGAATACTC	5480
ATACTCTTCC	TTTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTTATCAGG	5520
GTTATTGTCT	CATGAGCGGA	TACATATTTG	AATGTATTTA	5560
GAAAAATAAA	CAAATAGGGG	TTCCGCGCAC	ATTTCCCCGA	5600
AAAGTGCCAC	CTGACGTC			5618

REVENDICATIONS

1. Vecteur nucléotidique comprenant au moins :
  - un gène ou un ADN complémentaire codant pour au moins une partie d'une protéine d'un virus, et
  - 5        - un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires.
2. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le virus est celui d'une hépatite .
- 10        3. Vecteur selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il ne se réplique pas dans les cellules.
4. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le gène code pour au moins  
15        une partie d'une protéine du virus de l'hépatite B.
5. Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine est la protéine S, S-préS<sub>2</sub> ou S-préS<sub>2</sub>-PréS<sub>1</sub>.
6. Vecteur selon la revendication 4,  
20        caractérisé en ce que le gène est le gène S.
7. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le virus est celui d'une hépatite A ou d'une hépatite non-A, non-B, telle qu'une hépatite C , E ou delta.
- 25        8. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur du cytomégalovirus.
9. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 et 8, caractérisé en ce qu'il est le plasmide pCMV-HBS  
30        déposé sous le n° I-1370 auprès de la CNCM le 21 Octobre 1993.
10. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 et 8 , caractérisé en ce qu'il est le plasmide pCMVHB-S1.S2.S déposé auprès de la CNCM sous le n°I-

1411.

11. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 et 8 , caractérisé en ce qu'il est le plasmide pCMVHB-S2.S déposé auprès de la CNCM sous le n°I-1410.

5 12. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 , caractérisé en ce qu'il est le plasmide pRSV-HBS déposé sous le N°I-1371 auprès de la CNCM le 21 Octobre 1993.

10 13. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit promoteur est celui des gènes de surface du virus HBV.

14. Vecteur selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est le plasmide pHBV-S1.S2.S déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1409.

15 15. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur interne.

16. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur d'un gène d'une protéine du cytosquelette.

17. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend le promoteur de la desmine.

18. Vecteur selon l'une des revendications 16 et 17, caractérisé en ce que le promoteur est homologue à l'hôte auquel doit être administré le vecteur.

19. Vecteur selon l'une des revendications 1 et 3 , caractérisé en ce qu'il comprend des gènes codant au moins en partie pour la protéine gp160 du virus HIV1 associée à la protéine p25, et/ou à la protéine p55, et/ou à la protéine p18.

20. Vecteur selon l'une des revendications 1 et 3 , caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène codant pour la protéine Rev du virus HIV1.

21. Séquence nucléotidique comprenant un promoteur homologue à l'hôte et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN complémentaire codant pour S, S-prés<sub>2</sub> ou S-prés<sub>1</sub>-prés<sub>2</sub>.

22. Séquence nucléotidique comprenant un promoteur homologue à l'hôte et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN complémentaire codant pour la protéine gp160 associée à p25 et/ou à p55 et/ou à p18.

23. Séquence nucléotidique comprenant un promoteur homologue à l'hôte et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN complémentaire codant pour la protéine Rev.

24. Vaccin, caractérisé en ce qu'il contient au moins un vecteur selon l'une des revendications 1 à 20 ou une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 21 à 23.

25. Composition capable d'induire une réponse cytotoxique constituée par au moins une séquence nucléotidique exprimée dans les cellules musculaires et comportant un promoteur tel que défini dans l'une des revendications 15 à 18.

26. Composition pharmaceutique non lipidique destinée à l'immunisation à l'encontre d'une infection virale telle qu'une hépatite comprenant au moins d'une part une substance capable d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires et d'autre part un vecteur selon l'une des revendications 1 à 20 ou comportant la séquence nucléotidique complète ou partielle selon l'une des revendications 21 à 23.

27. Composition selon la revendication 26, caractérisée en ce que ladite substance est la bupivacaine.

28. Composition selon la revendication 27, caractérisée en ce que ledit vecteur est administré dans le muscle de l'individu à immuniser, au minimum cinq jours après administration de la bupivacaine, sensiblement au même endroit.

29. Composition selon la revendication 28, caractérisée en ce que le vecteur est administré dix jours après administration de la bupivacaine.

30. Composition selon l'une des revendications 26 à 29, caractérisée en ce que l'administration est effectuée par injection intramusculaire.

31. Composition selon la revendication 30, caractérisée en ce que l'injection intramusculaire est effectuée à l'aide d'un pistolet à jet liquide.

15

20

1/9

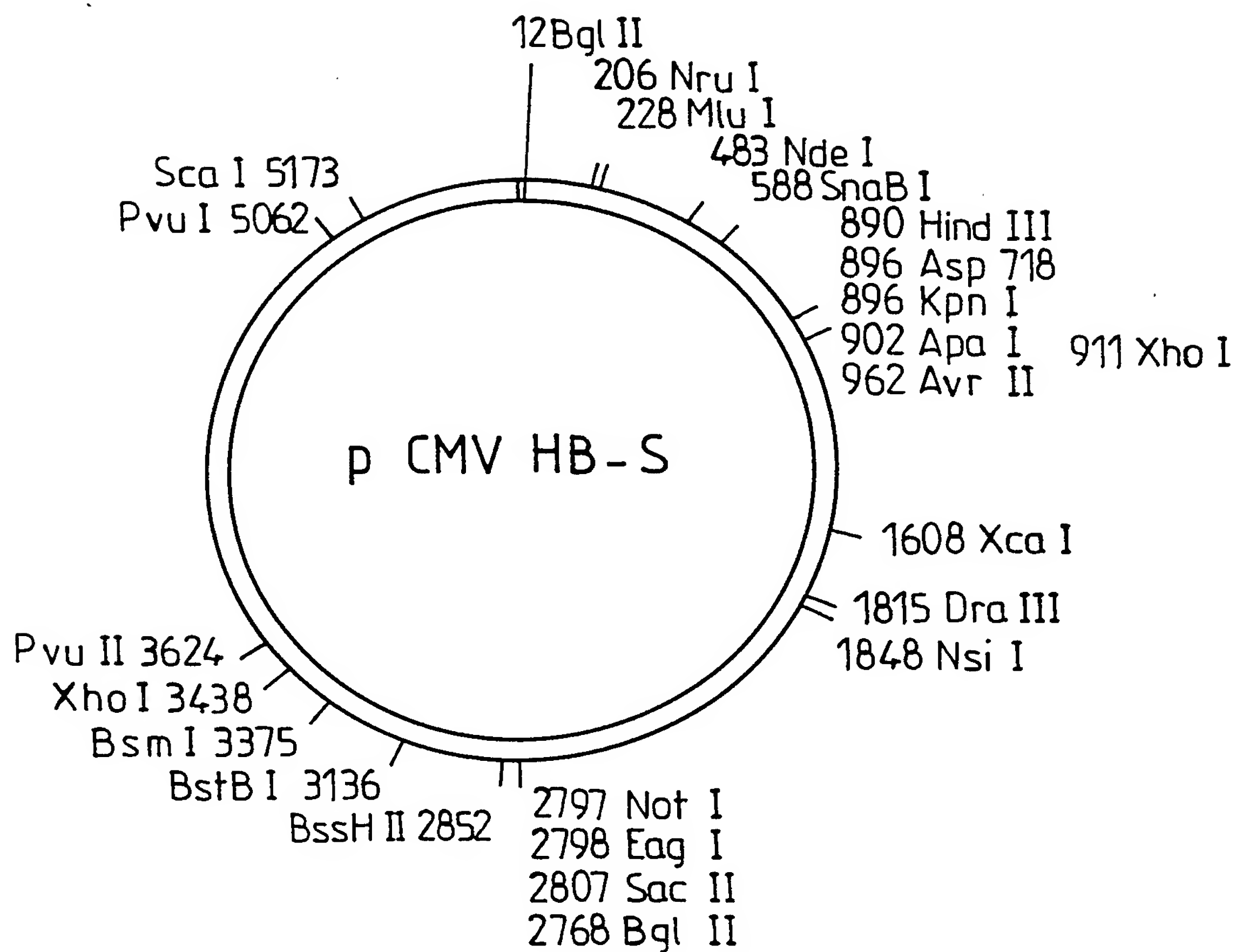


FIG.1



2/9

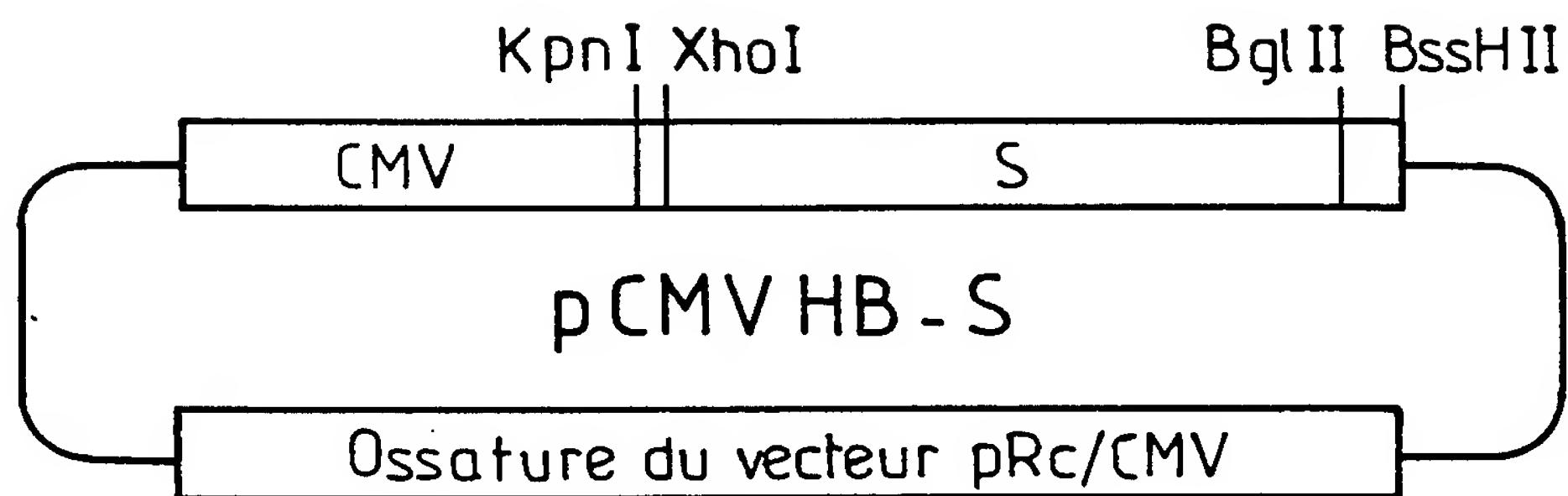


FIG.2A

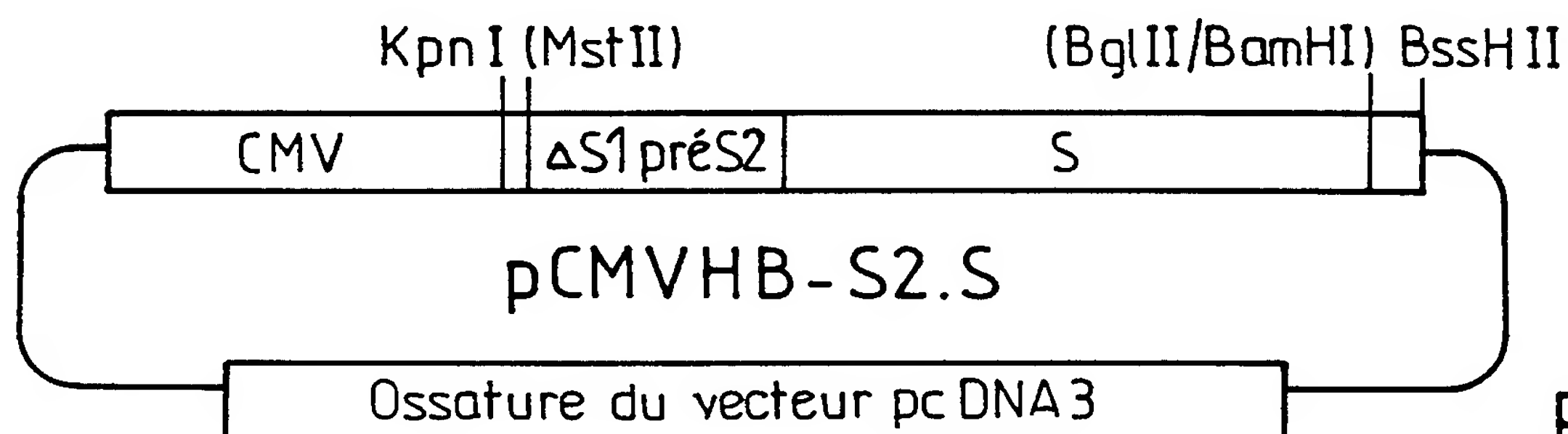


FIG.2B

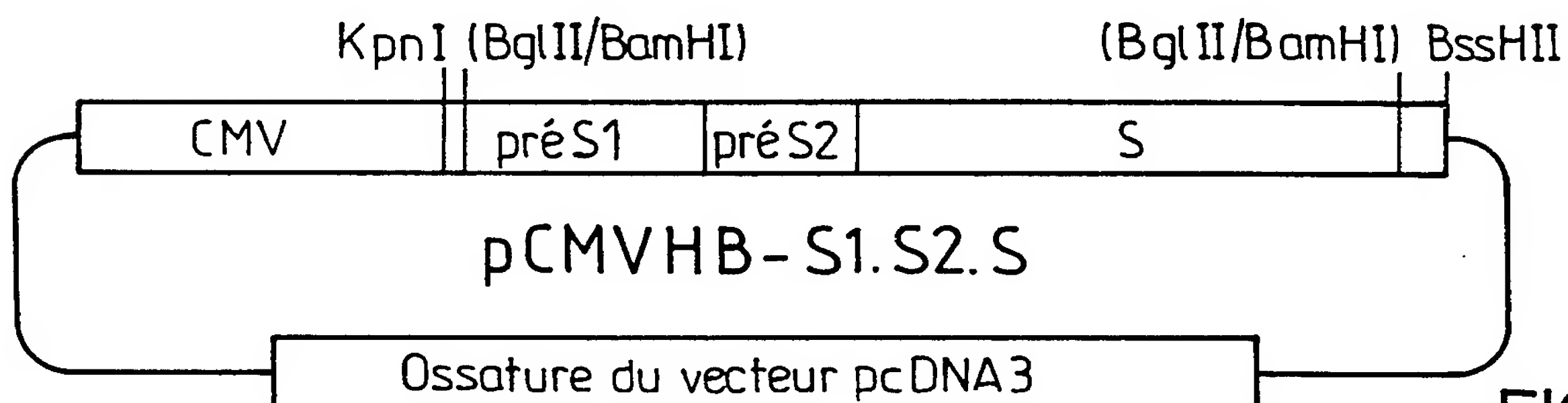


FIG.2C

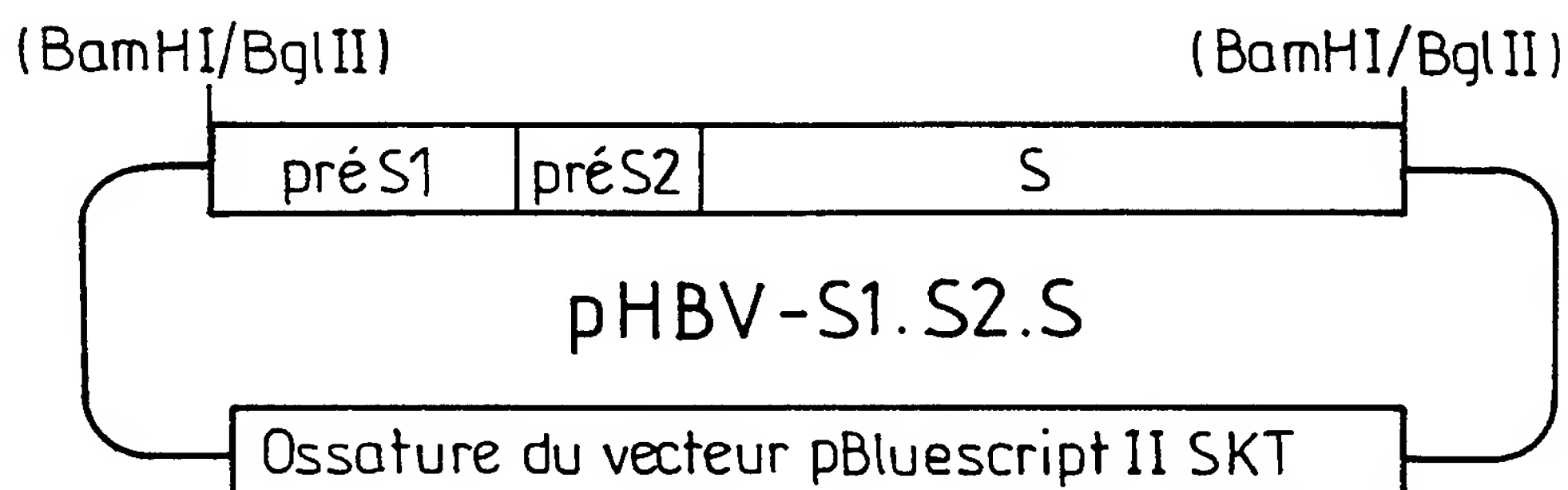


FIG.2D

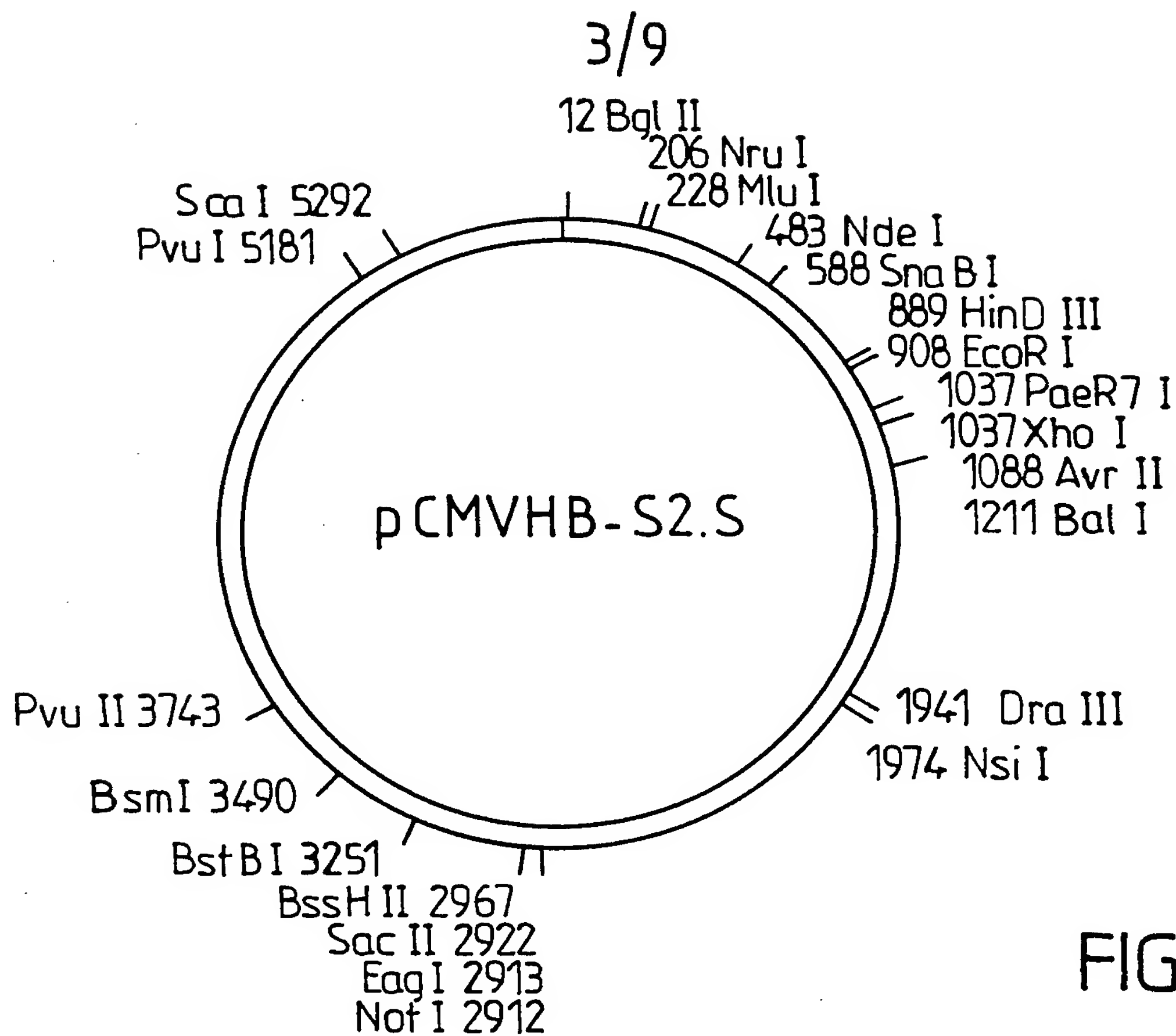


FIG. 3

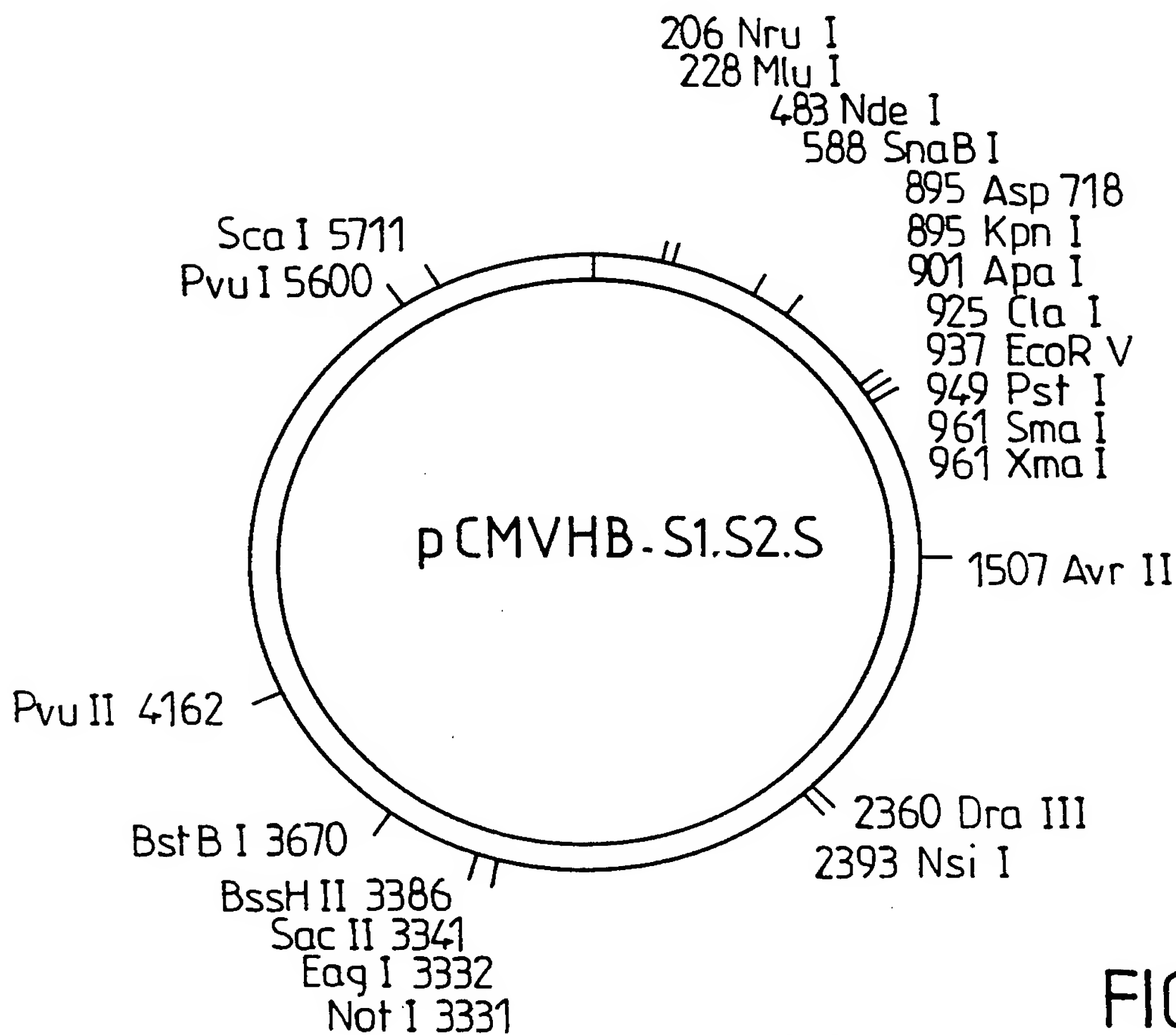


FIG. 4

4/9

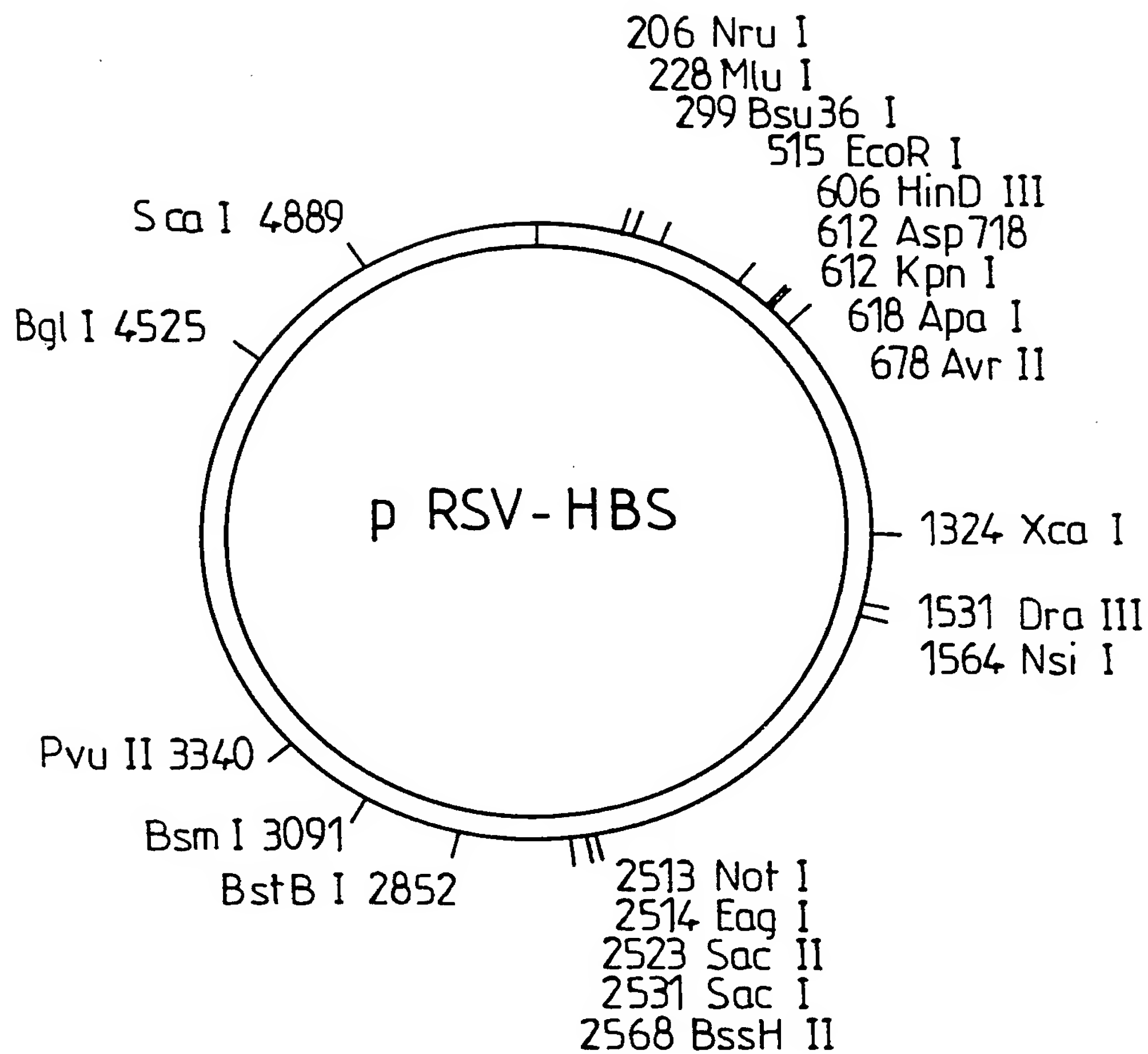


FIG. 5

5/9

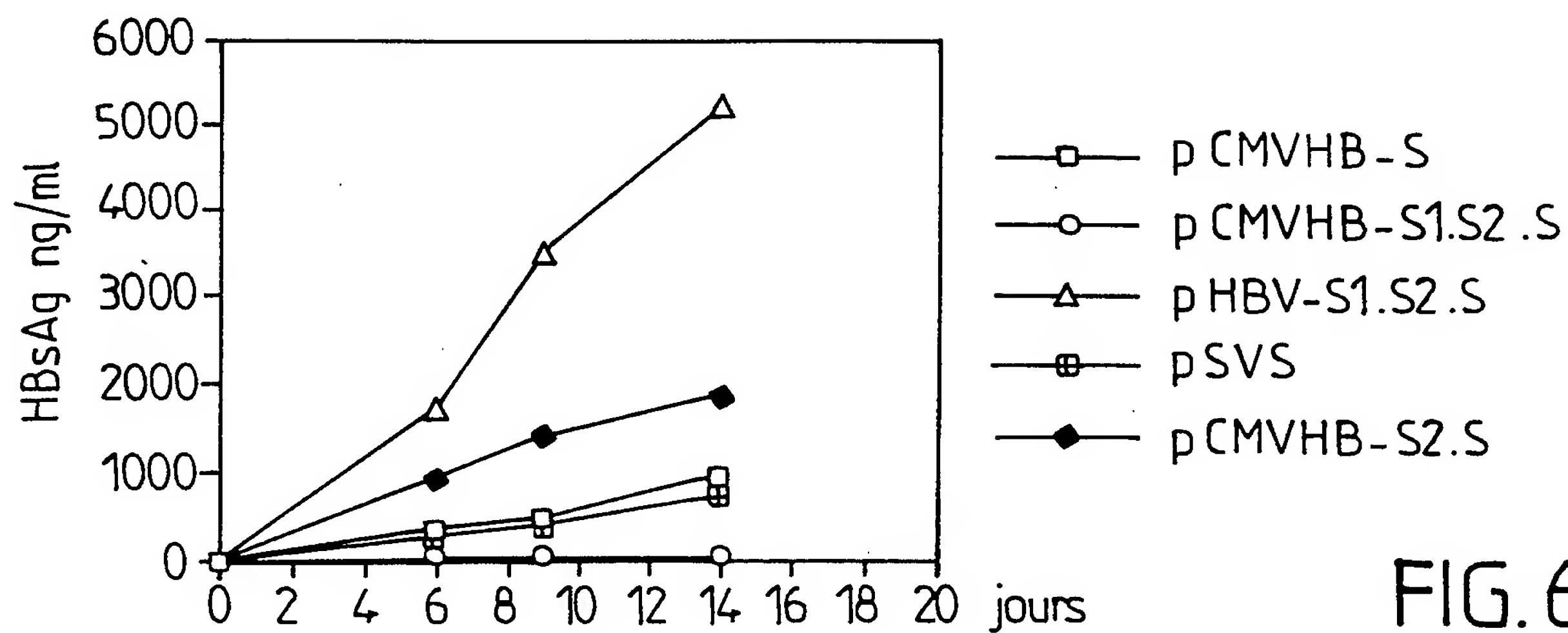


FIG. 6

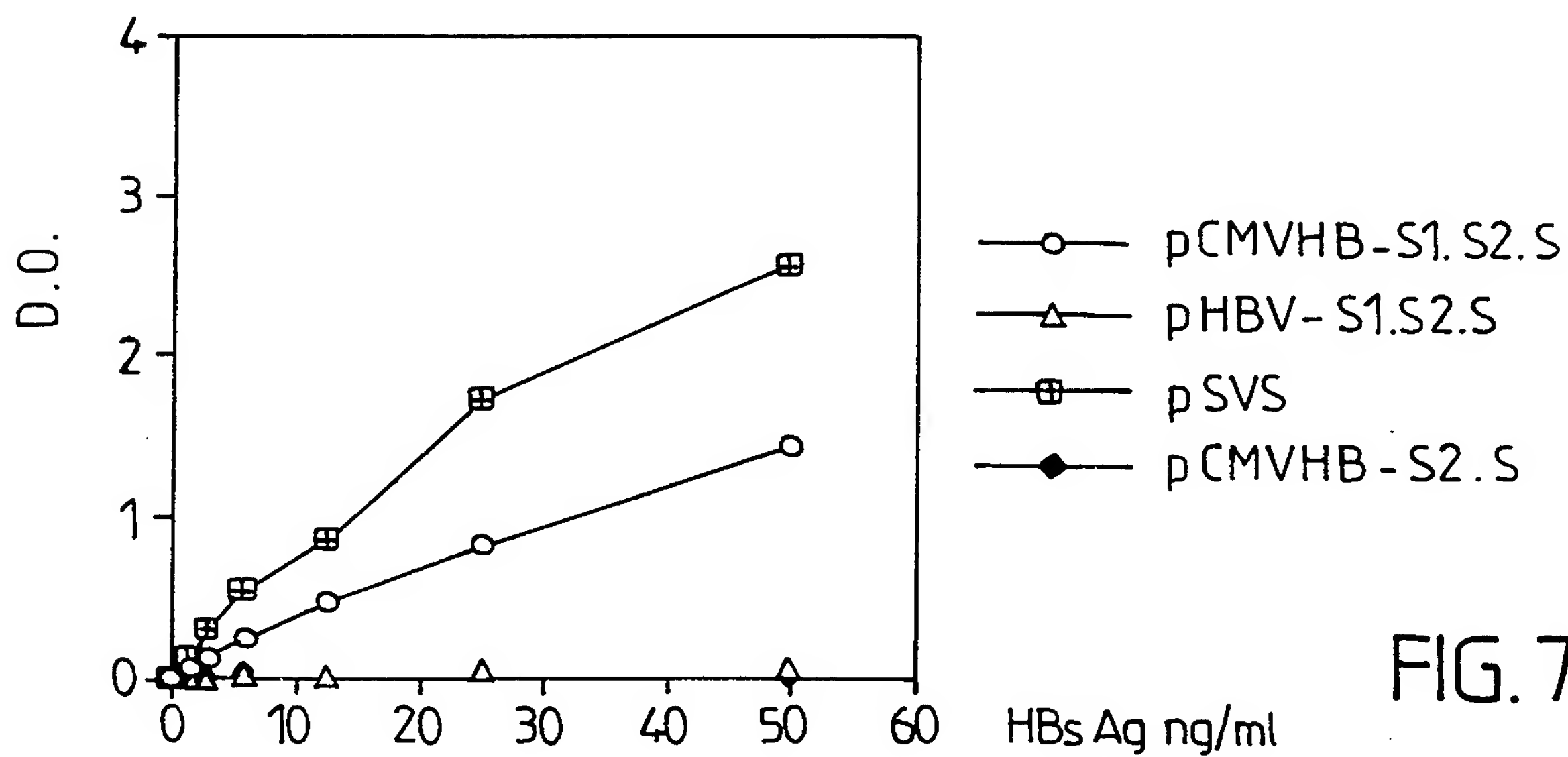


FIG. 7A

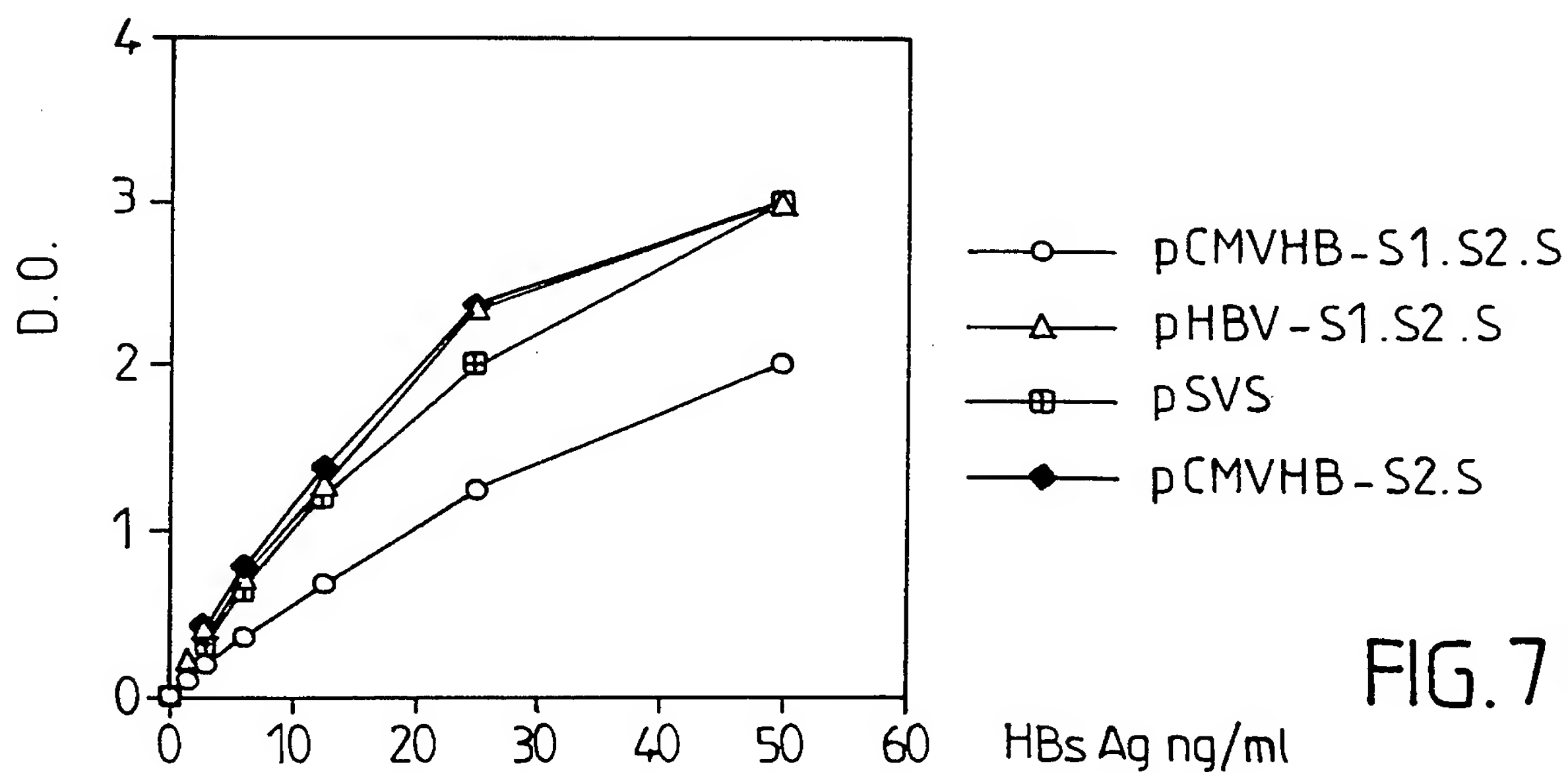


FIG. 7 B

6/9

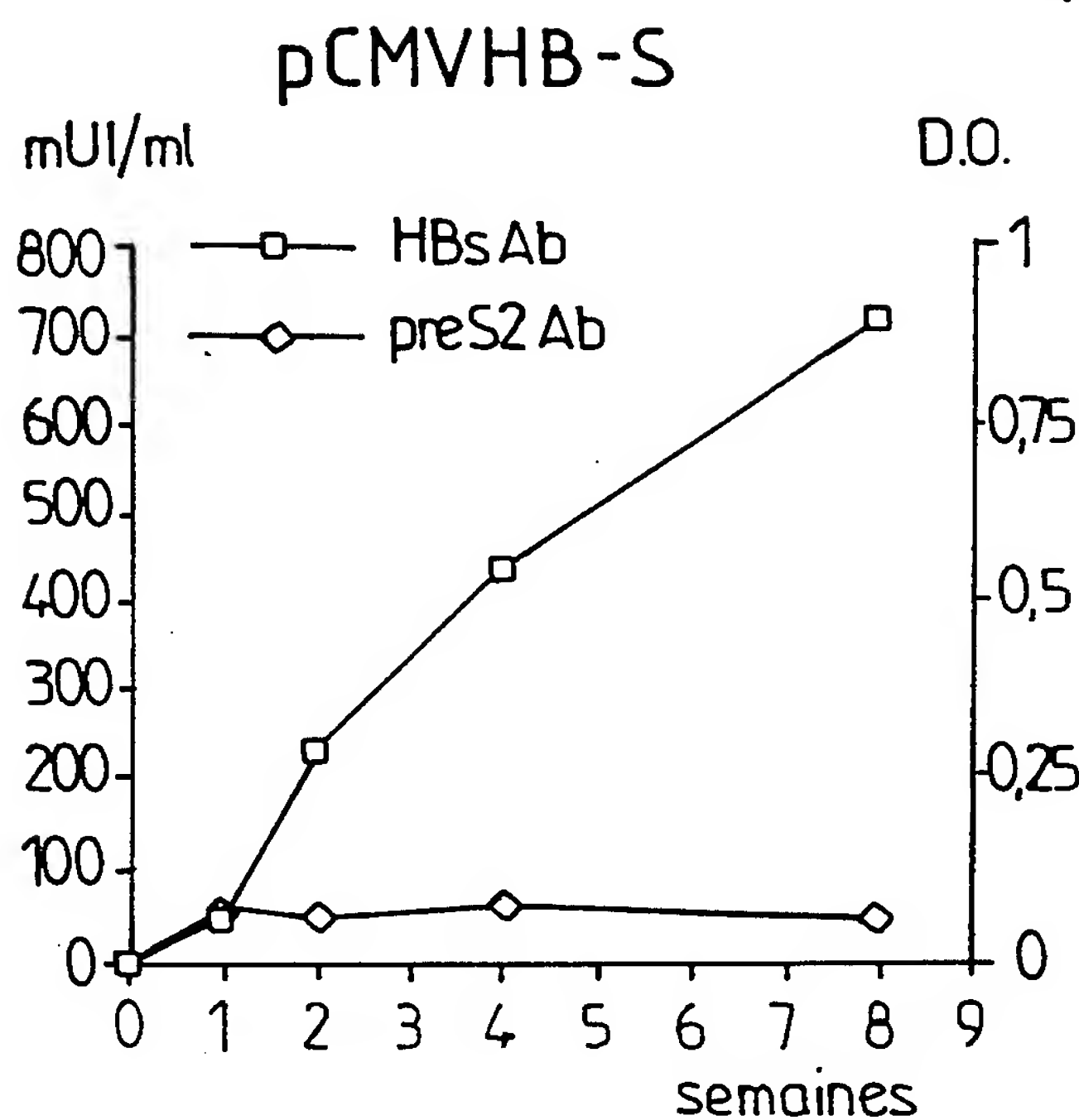


FIG.8A

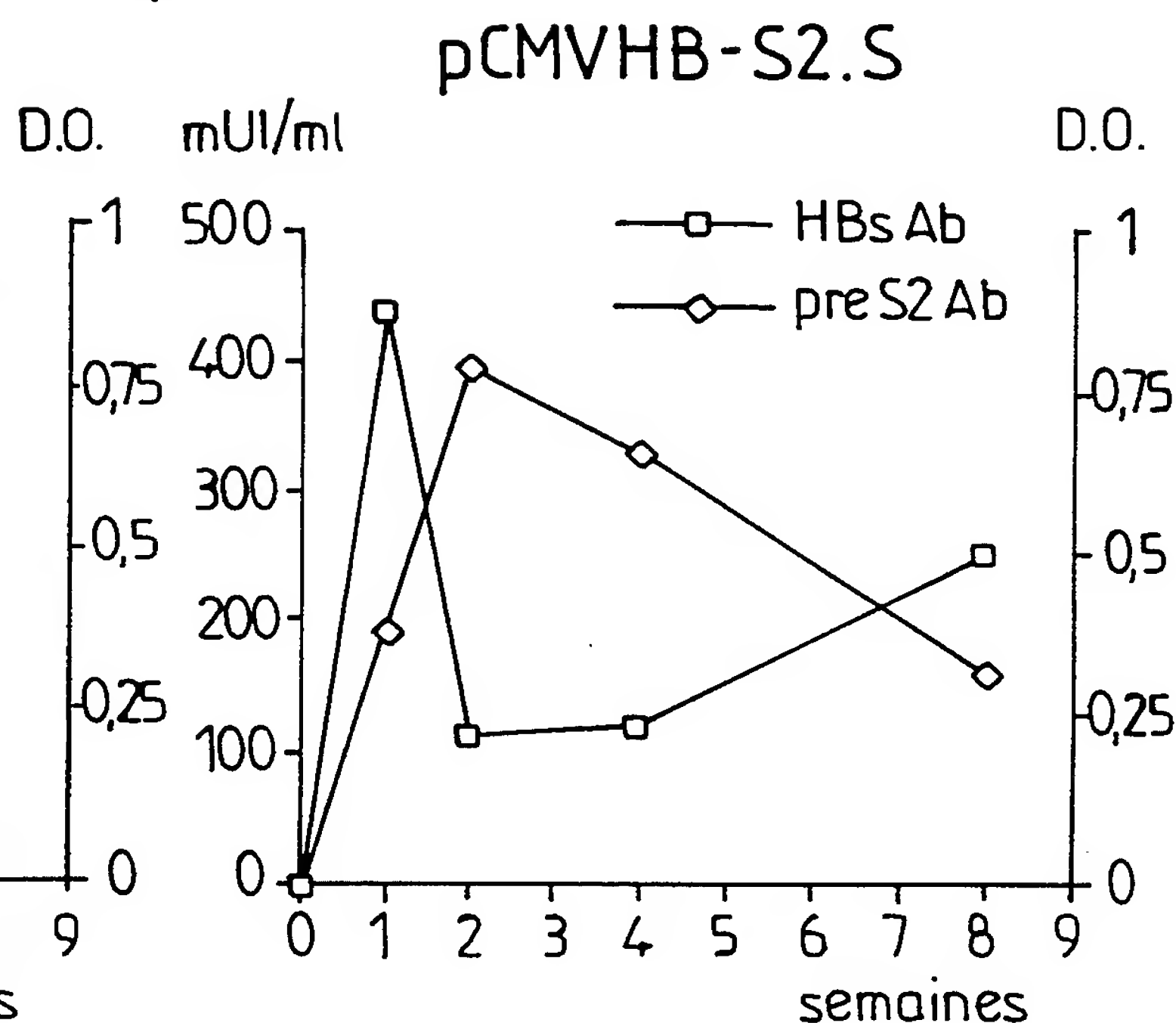


FIG.8B

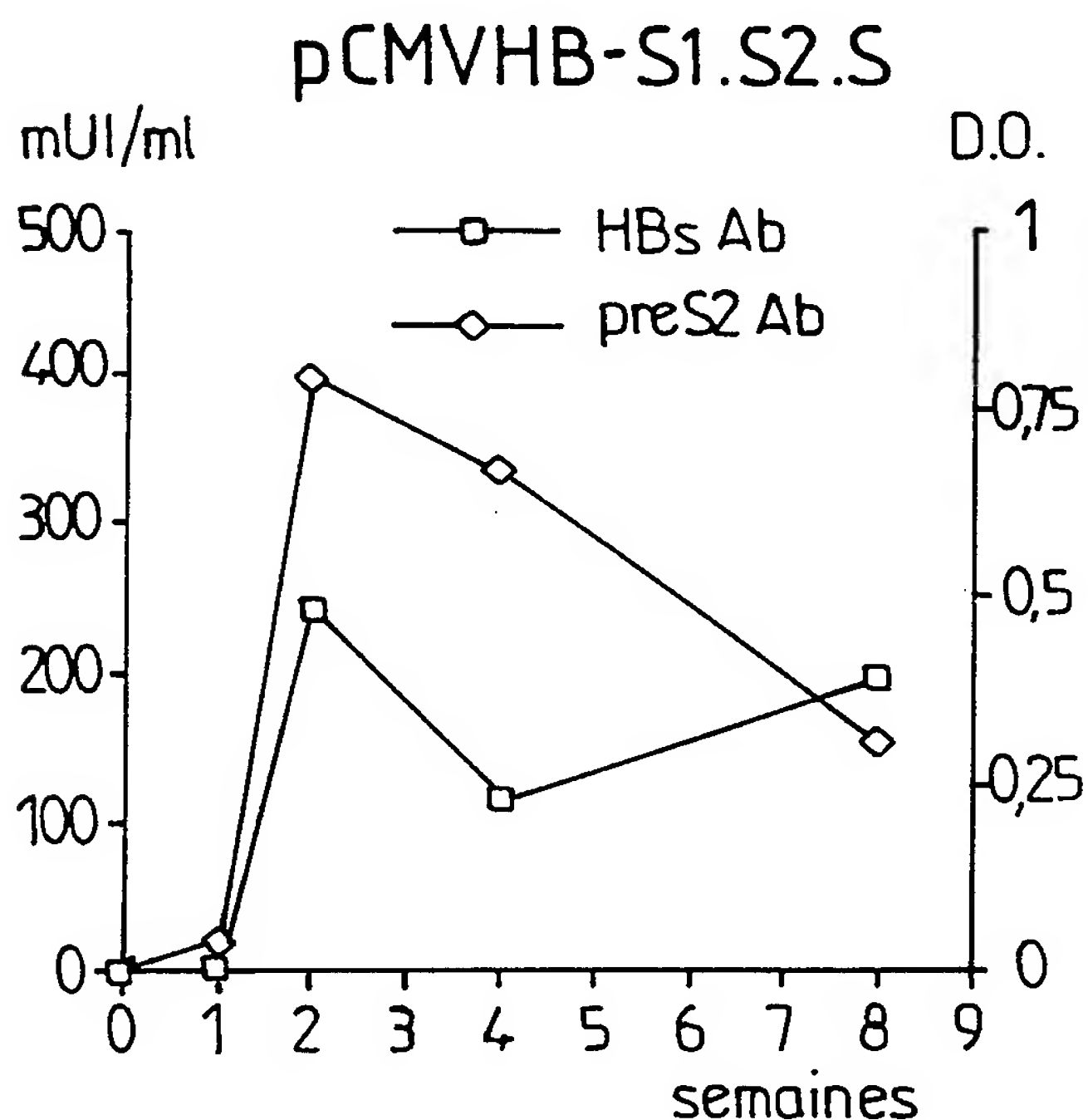


FIG.8C

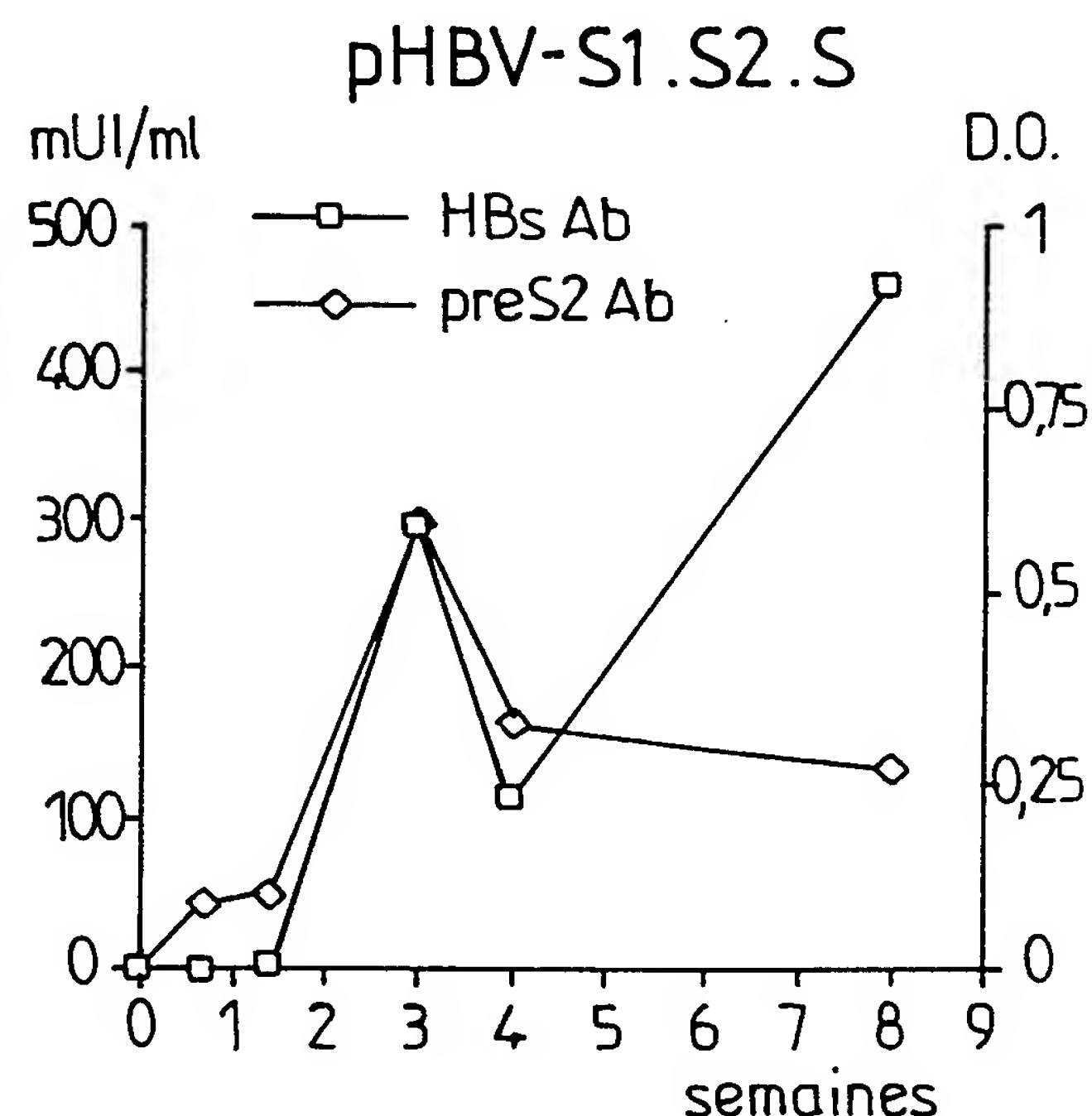


FIG.8D

7/9

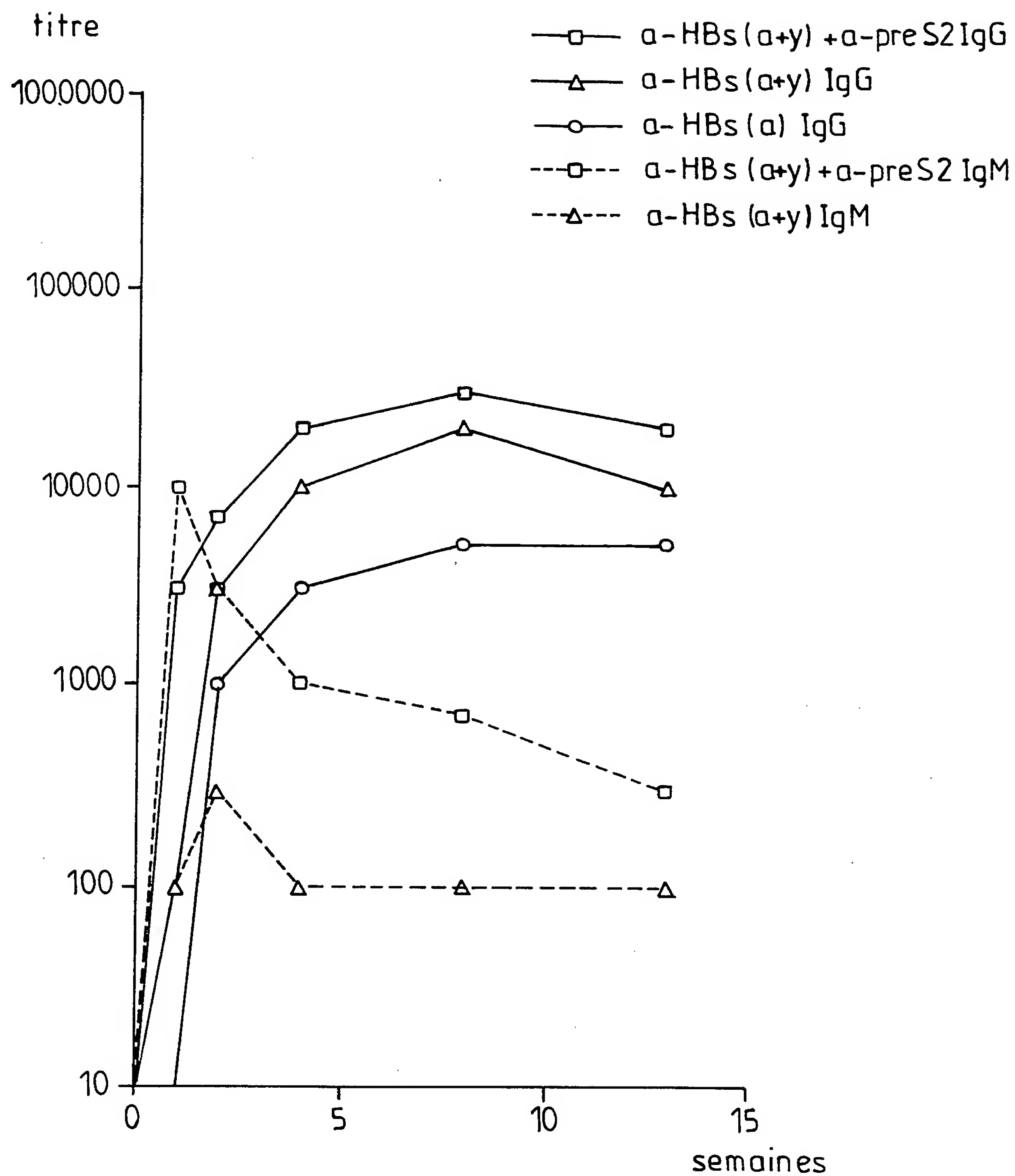
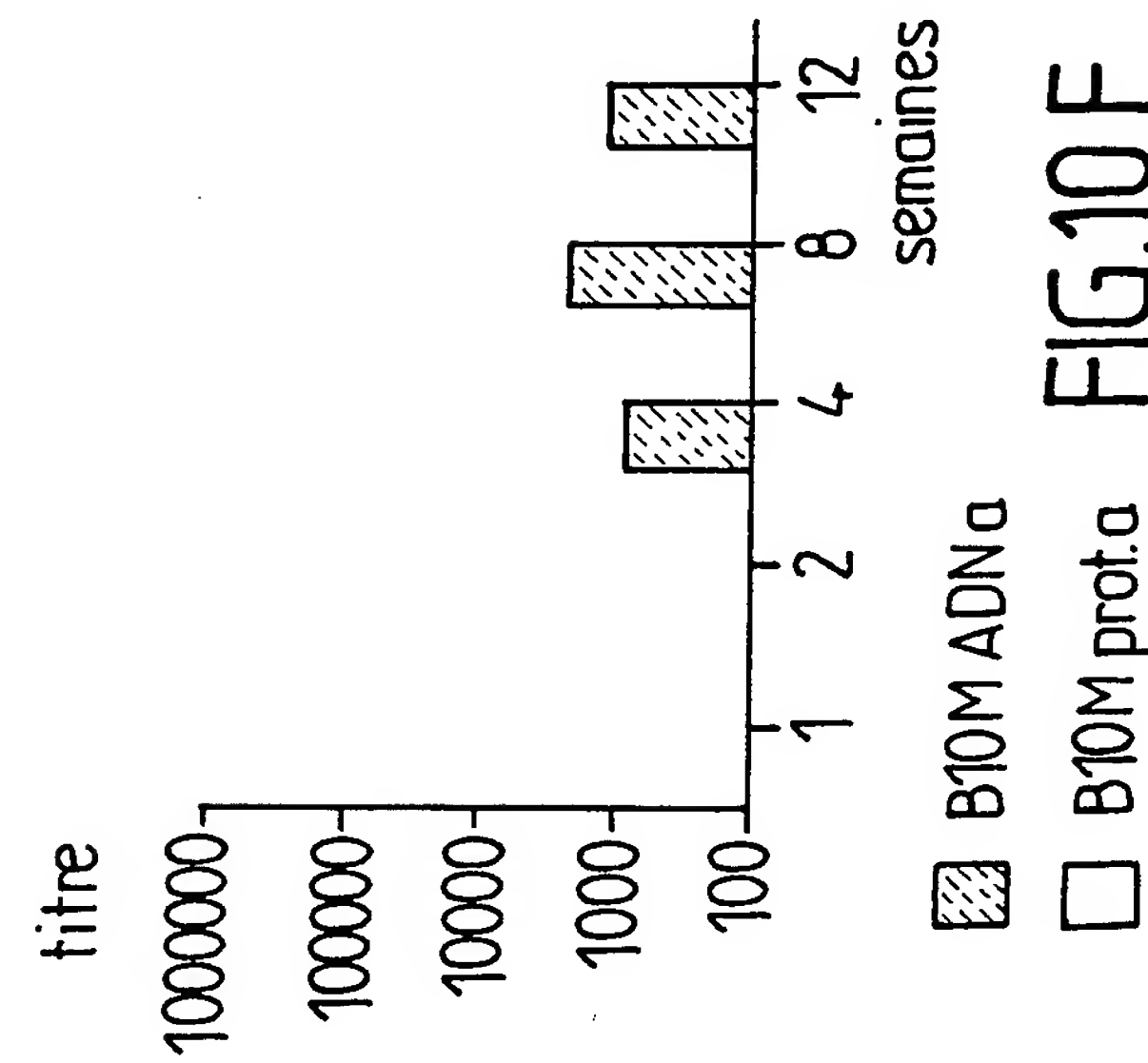
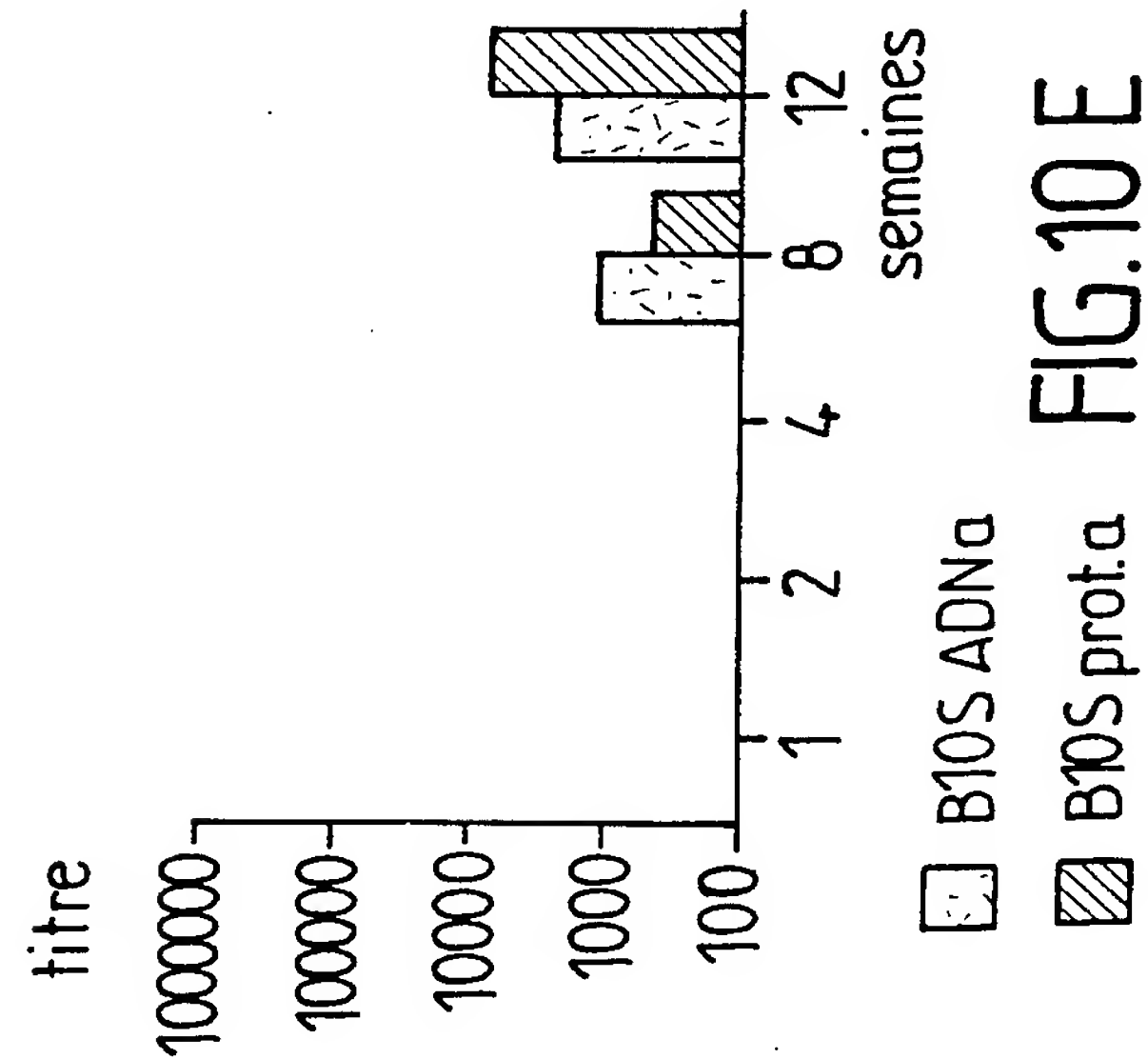
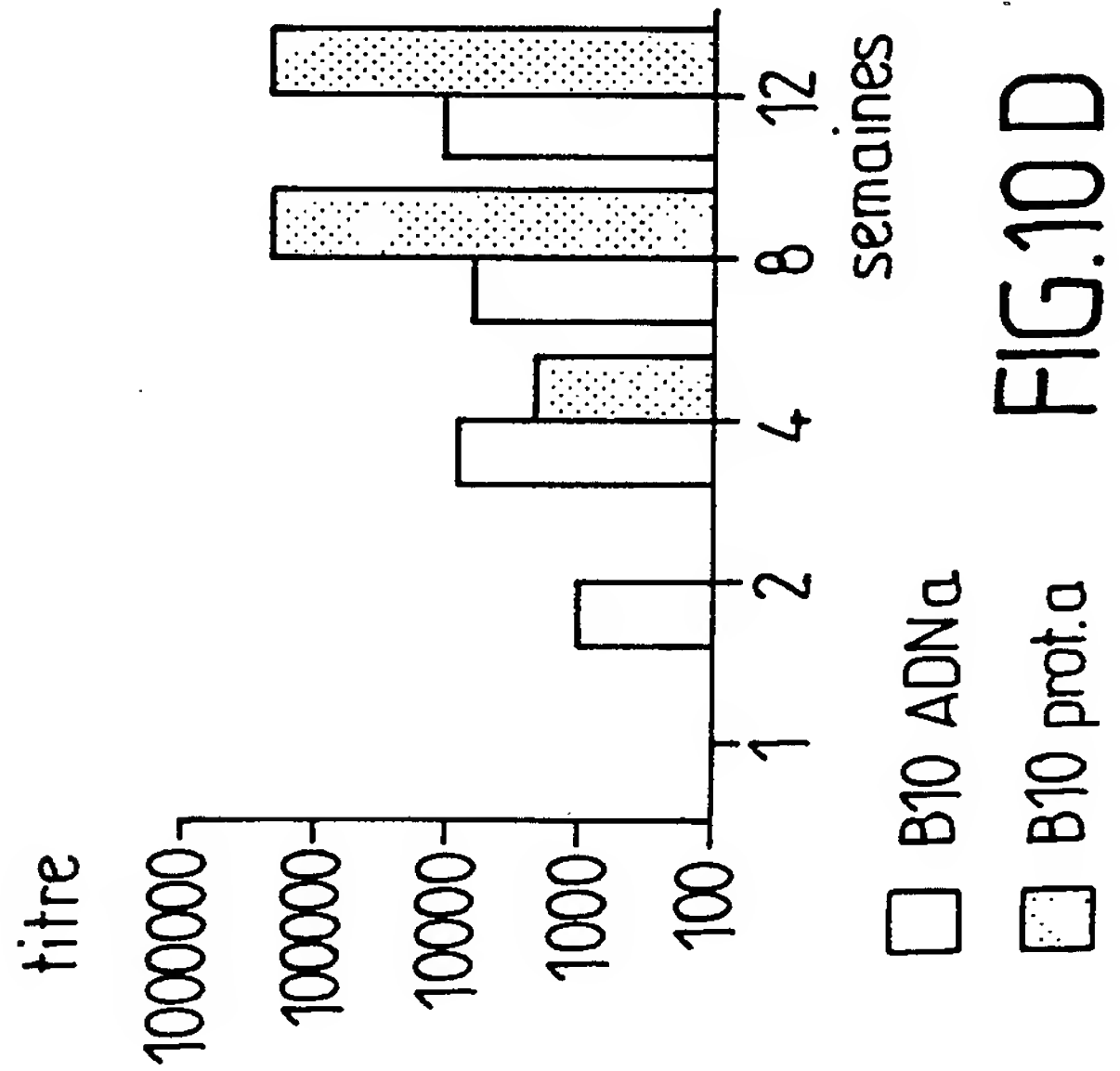
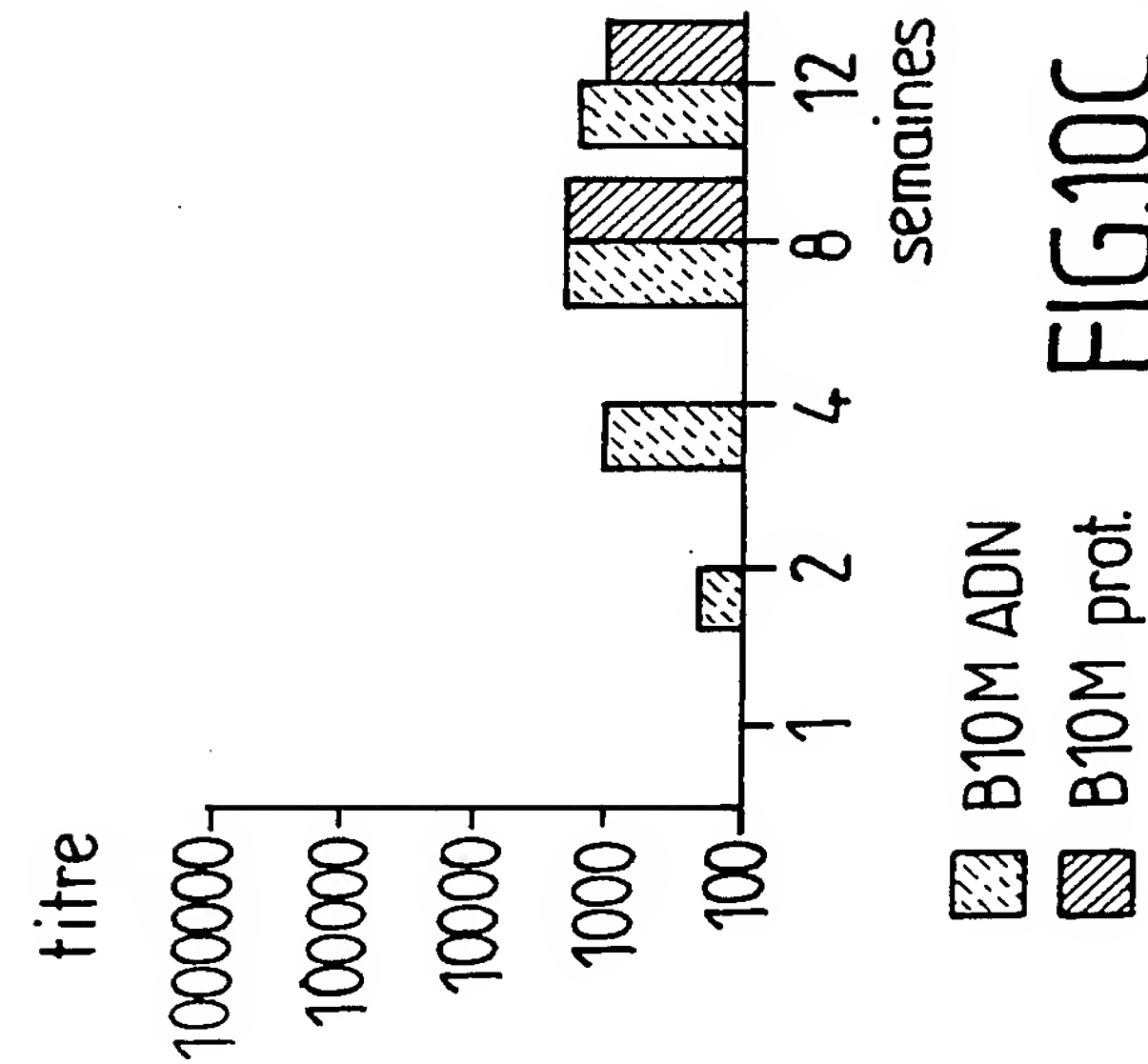
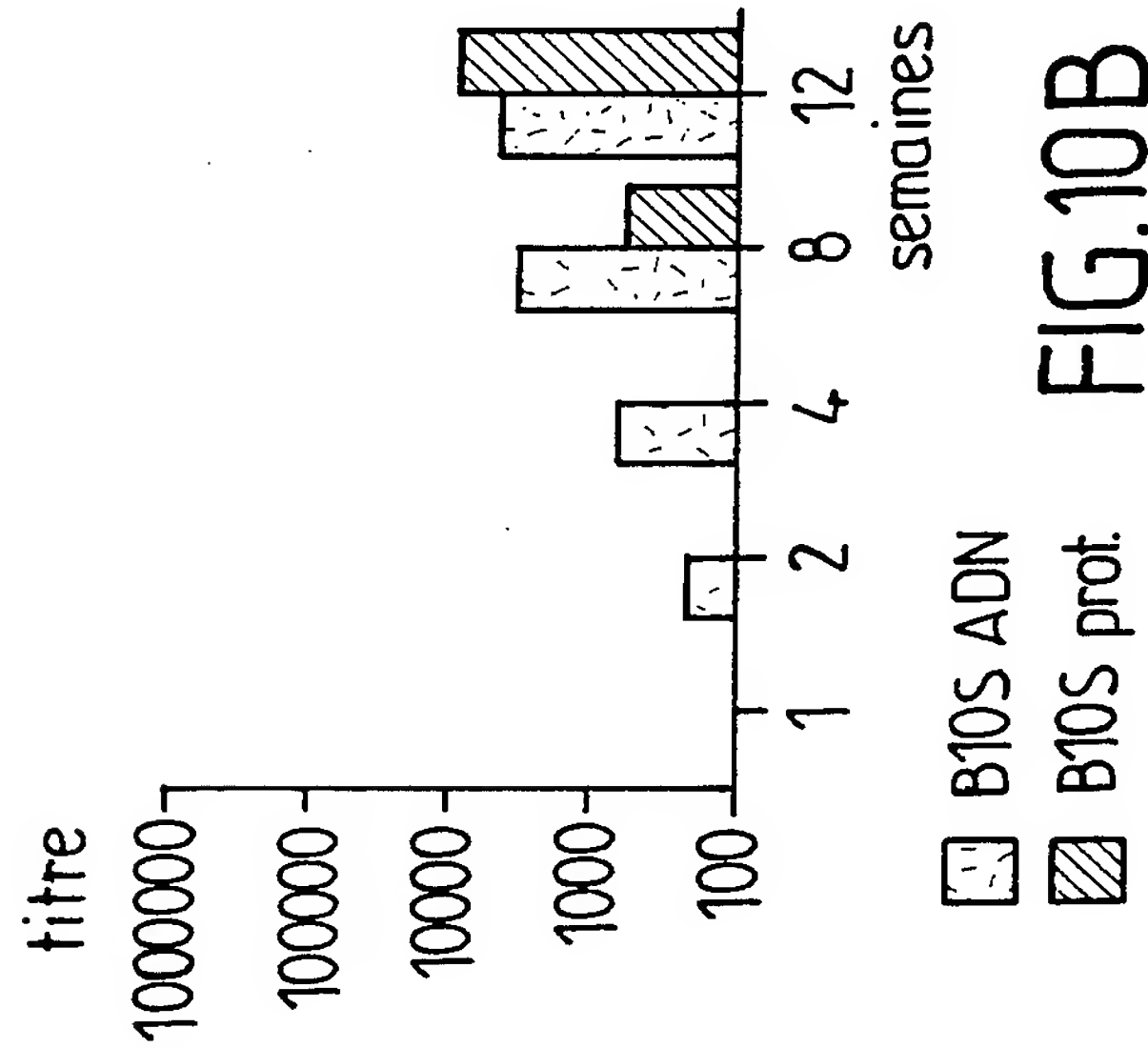
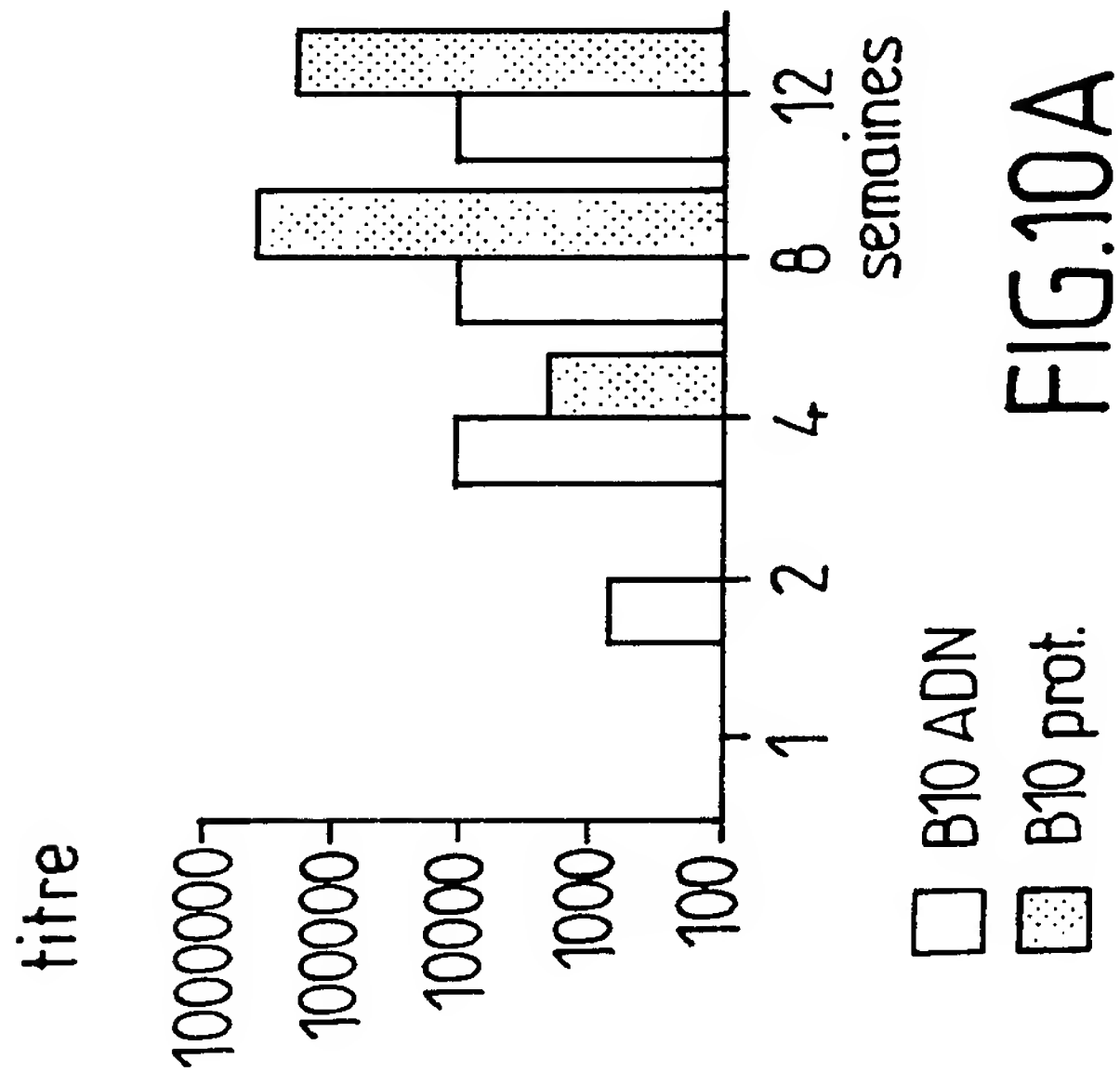


FIG. 9





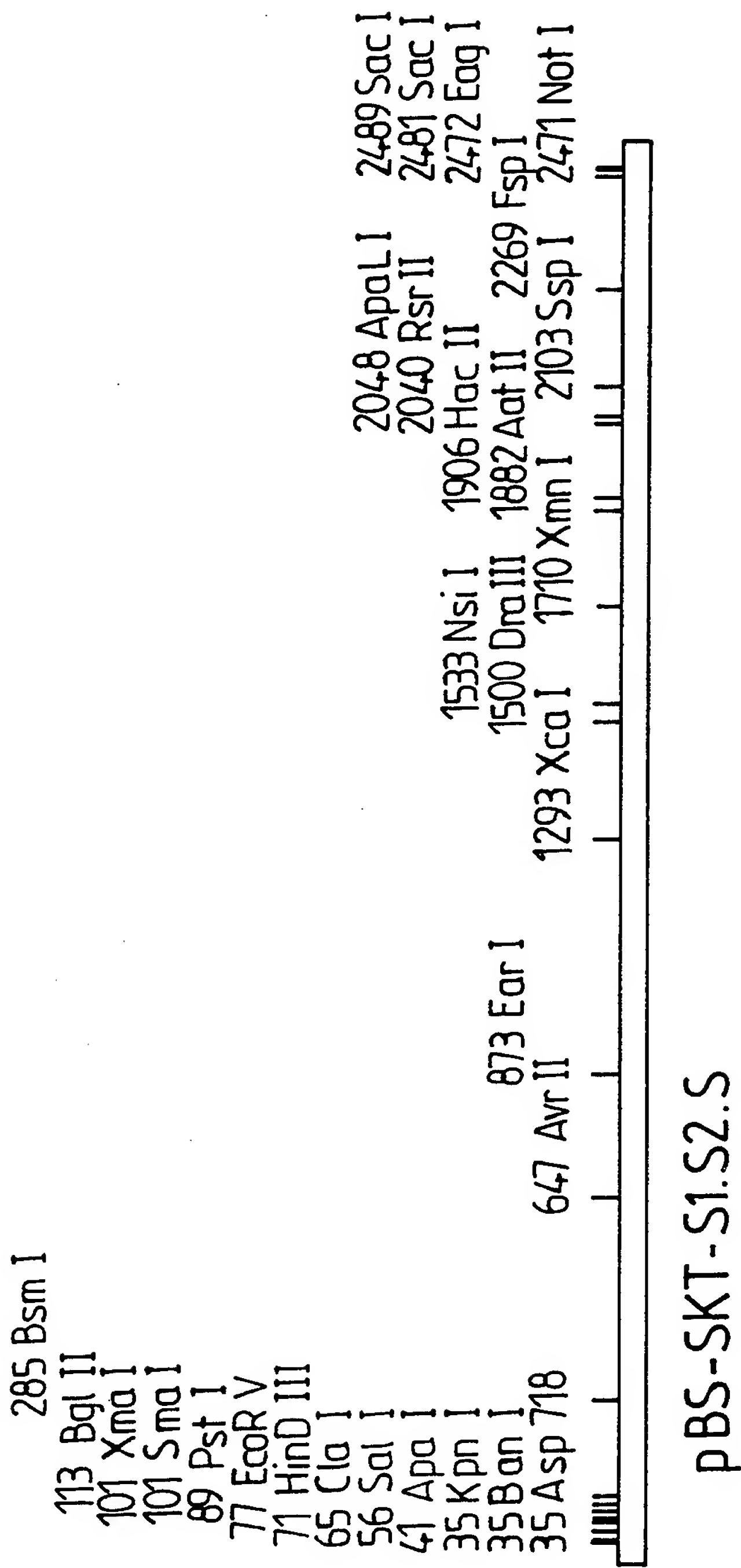


FIG.11

20 JUIN 1994

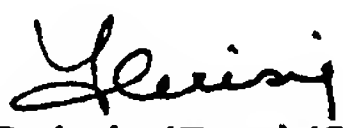
FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

**INSTITUT PASTEUR**  
**Bureau des Brevets et Inventions**  
**25-28, Rue du Docteur Roux**  
**75724 PARIS CEDEX 15**

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

<b>I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT :  <b>pHBV-S1.S2.S</b>	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :  <b>I - 1409</b>
<b>II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE</b>	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :  <input checked="" type="checkbox"/> d'une description scientifique  <input checked="" type="checkbox"/> d'une désignation taxonomique proposée  (Cocher ce qui convient)	
<b>III. RECEPTION ET ACCEPTATION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le <b>22 avril 1994</b> (date du dépôt initial) 1	
<b>IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
<b>V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE</b>	
Nom :  <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes  Adresse :  <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : <b>Mme Y. CERISIER</b> Directeur Administratif de la CNCM   Date : <b>Paris, le 17 mai 1994</b>

1 En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut  
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

20 JUIN 1994

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :



**Madame D. BERNEMAN**  
**Bureau des Brevets et Inventions**  
**INSTITUT PASTEUR**  
**28, Rue du Docteur Roux**  
**75724 PARIS CEDEX 15**

DECLARATION SUR LA VIABILITE,  
délivrée en vertu de la règle 10.2 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée à la page suivante

NOM ET ADRESSE DE LA PARTIE  
A LAQUELLE LA DECLARATION SUR LA  
VIABILITE EST DELIVREE

<b>I. DEPOSANT</b>	<b>II. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>
Nom : <b>INSTITUT PASTEUR</b>	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : <b>I - 1409</b>
Adresse : <b>Bureau des Brevets et Inventions</b> <b>25-28, Rue du Docteur Roux</b> <b>75724 PARIS CEDEX 15</b>	Date du dépôt ou du transfert <sup>1</sup> : <b>22 avril 1994</b>
<b>III. DECLARATION SUR LA VIABILITE</b>	
La viabilité du micro-organisme identifié sous chiffre II a été contrôlée le <b>25 avril 1994</b> 2. A cette date, le micro-organisme	
<input checked="checked" type="checkbox"/> <sup>3</sup> était viable	
<input type="checkbox"/> <sup>3</sup> n'était plus viable	

- 1 Indiquer la date du dépôt initial ou, si un nouveau dépôt ou un transfert ont été effectués, la plus récente des dates pertinentes (date du nouveau dépôt ou date du transfert).
- 2 Dans les cas visés à la règle 10.2.a)ii) et iii), mentionner le contrôle de viabilité le plus récent.
- 3 Cocher la case qui convient.

IV. CONDITIONS DANS LESQUELLES LE CONTROLE DE VIABILITE A ETE EFFECTUE <sup>4</sup>	
V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE	
<p>Nom : <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes</p> <p>Adresse : <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE</p>	<p>Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) :</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>Yvonne CERISIER</b> Directeur administratif de la CNCM</p>  </div> <div style="width: 45%;"> <p><b>Georges WAGENER</b> Conseiller Scientifique de la CNCM pour les souches bactériennes</p>  </div> </div> <p>Date : Paris, le 17 mai 1994</p>

4 A remplir si cette information a été demandée et si les résultats du contrôle étaient négatifs.

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

20 JUIN 1994


FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

**INSTITUT PASTEUR**  
**Bureau des Brevets et Inventions**  
**25-28, Rue du Docteur Roux**  
**75724 PARIS CEDEX 15**

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

<b>I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT :  <b>pCMVHB-S2.S</b>	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :  <b>I - 1410</b>
<b>II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE</b>	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :  <input checked="" type="checkbox"/> d'une description scientifique  <input checked="" type="checkbox"/> d'une désignation taxonomique proposée  (Cocher ce qui convient)	
<b>III. RECEPTION ET ACCEPTATION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le <b>22 avril 1994</b> (date du dépôt initial) 1	
<b>IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
<b>V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE</b>	
Nom :  <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes  Adresse :  <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : <b>Mme Y. CERISIER</b> Directeur Administratif de la CNCM   Date : <b>Paris, le 17 mai 1994</b>

1 En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut  
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

20 JUIN 1994

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :


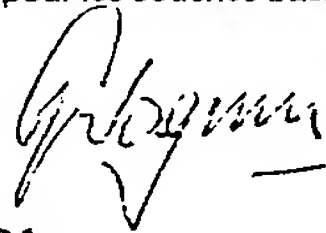
**Madame D. BERNEMAN**  
**Bureau des Brevets et Inventions**  
**INSTITUT PASTEUR**  
**28, Rue du Docteur Roux**  
**75724 PARIS CEDEX 15**

DECLARATION SUR LA VIABILITE,  
délivrée en vertu de la règle 10.2 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée à la page suivante

NOM ET ADRESSE DE LA PARTIE  
A LAQUELLE LA DECLARATION SUR LA  
VIABILITE EST DELIVREE

<b>I. DEPOSANT</b>	<b>II. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>
Nom : <b>INSTITUT PASTEUR</b>	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : <b>I - 1410</b>
Adresse : <b>Bureau des Brevets et Inventions</b> <b>25-28, Rue du Docteur Roux</b> <b>75724 PARIS CEDEX 15</b>	Date du dépôt ou du transfert <sup>1</sup> : <b>22 avril 1994</b>
<b>III. DECLARATION SUR LA VIABILITE</b>	
La viabilité du micro-organisme identifié sous chiffre II a été contrôlée le <b>25 avril 1994</b> 2. A cette date, le micro-organisme	
<input checked="checked" type="checkbox"/> <sup>3</sup> était viable	
<input type="checkbox"/> <sup>3</sup> n'était plus viable	

- 1 Indiquer la date du dépôt initial ou, si un nouveau dépôt ou un transfert ont été effectués, la plus récente des dates pertinentes (date du nouveau dépôt ou date du transfert).
- 2 Dans les cas visés à la règle 10.2.a)ii) et iii), mentionner le contrôle de viabilité le plus récent.
- 3 Cocher la case qui convient.

IV. CONDITIONS DANS LESQUELLES LE CONTROLE DE VIABILITE A ETE EFFECTUE <sup>4</sup>	
V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE	
<p>Nom : <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes</p> <p>Adresse : <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE</p>	<p>Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) :</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p><b>Yvonne CERISIER</b> Directeur administratif de la CNCM</p>  </div> <div> <p><b>Georges WAGENER</b> Conseller Scientifique de la CNCM pour les souches bactériennes</p>  </div> </div> <p>Date : Paris, le 17 mai 1994</p>

4 A remplir si cette information a été demandée et si les résultats du contrôle étaient négatifs.



TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

20 JUIN 1994

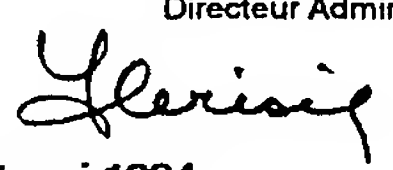
FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

**INSTITUT PASTEUR**  
**Bureau des Brevets et Inventions**  
**25-28, Rue du Docteur Roux**  
**75724 PARIS CEDEX 15**

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

<b>I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT :  <b>pCMVHB-S1.S2.S</b>	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :  <b>I - 1411</b>
<b>II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE</b>	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :  <input checked="" type="checkbox"/> d'une description scientifique  <input checked="" type="checkbox"/> d'une désignation taxonomique proposée  (Cocher ce qui convient)	
<b>III. RECEPTION ET ACCEPTATION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le <b>22 avril 1994</b> (date du dépôt initial) 1	
<b>IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
<b>V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE</b>	
Nom :  <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes  Adresse :  <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : <b>Mme Y. CERISIER</b> Directeur Administratif de la CNCM    Date : <b>Paris, le 17 mai 1994</b>

1 En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut  
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

20 JUIN 1994

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

**Madame D. BERNEMAN**  
**Bureau des Brevets et inventions**  
**INSTITUT PASTEUR**  
**28, Rue du Docteur Roux**  
**75724 PARIS CEDEX 15**

DECLARATION SUR LA VIABILITE,  
délivrée en vertu de la règle 10.2 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée à la page suivante

NOM ET ADRESSE DE LA PARTIE  
A LAQUELLE LA DECLARATION SUR LA  
VIABILITE EST DELIVREE

I. DEPOSANT	II. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME
Nom : <b>INSTITUT PASTEUR</b>	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : <b>I - 1411</b>
Adresse : <b>Bureau des Brevets et inventions</b> <b>25-28, Rue du Docteur Roux</b> <b>75724 PARIS CEDEX 15</b>	Date du dépôt ou du transfert <sup>1</sup> : <b>22 avril 1994</b>
III. DECLARATION SUR LA VIABILITE	
La viabilité du micro-organisme identifié sous chiffre II a été contrôlée le <b>25 avril 1994</b> 2. A cette date, le micro-organisme	
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> était viable	
<input type="checkbox"/> <sup>3</sup> n'était plus viable	

- 1 Indiquer la date du dépôt initial ou, si un nouveau dépôt ou un transfert ont été effectués, la plus récente des dates pertinentes (date du nouveau dépôt ou date du transfert).
- 2 Dans les cas visés à la règle 10.2.a)ii) et iii), mentionner le contrôle de viabilité le plus récent.
- 3 Cocher la case qui convient.

IV. CONDITIONS DANS LESQUELLES LE CONTROLE DE VIABILITE A ETE EFFECTUE <sup>4</sup>	
V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE	
<p>Nom : <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes</p> <p>Adresse : <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE</p>	<p>Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) :</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>Yvonne CERISIER</b> Directeur administratif de la CNCM</p> <p><i>Y. Cerisier</i></p> </div> <div style="width: 45%;"> <p><b>Georges WAGENER</b> Conseiller Scientifique de la CNCM pour les souches bactériennes</p> <p><i>G. Wagener</i></p> </div> </div> <p>Date : Paris, le 17 mai 1994</p>

4 A remplir si cette information a été demandée et si les résultats du contrôle étaient négatifs.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No  
PCT/FR 94/00483

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/85 A61K48/00 A61K39/12 A61K39/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 09236 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 13 May 1993	1,3,8, 24,25
Y	see page 12, line 13 - line 15; claims 6,38-43	2,4-7, 13,16, 17, 19-23, 26-31
Y	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.90, 1993, WASHINGTON US pages 4156 - 4160 WANG ET AL. cited in the application see the whole document --- -/--	19,20, 22,23, 26-30



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 1994

Date of mailing of the international search report

19-08-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 94/00483

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCES ET AVENIR, September 1993, FR pages 22 - 25 P.CHAMBON cited in the application see the whole document ---	4
Y	DEVELOPMENT, vol.117, no.3, March 1993, CAMBRIDGE GB pages 947 - 959 LI Z ET AL 'DESMIN SEQUENCE ELEMENTS REGULATING SKELETAL MUSCLE-SPECIFIC EXPRESSION IN TRANSGENIC MICE' see the whole document ---	16,17
Y	WO,A,88 06185 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 25 August 1988 see page 18, line 1 - line 6; claims 22-31 ---	2,4-6, 13,21
Y	WO,A,92 06212 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 16 April 1992 see claims 17-19 ---	20,23
Y	WO,A,93 17111 (THE WELLCOME FOUNDATION LTD.) 2 September 1993 see claims 1-15 ---	7
Y	US,A,4 592 742 (SERGIO LANDAU) 3 June 1986 see the whole document -----	31

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern al Application No

PCT/FR 94/00483

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9309236	13-05-93	US-A- 5298422 AU-A- 3124693 CA-A- 2122617 PT-A- 101042	29-03-94 07-06-93 13-05-93 28-02-94
WO-A-8806185	25-08-88	AU-A- 1391888 EP-A- 0301083 ZA-A- 8800970	14-09-88 01-02-89 10-08-88
WO-A-9206212	16-04-92	EP-A- 0502179	09-09-92
WO-A-9317111	02-09-93	AU-B- 3572593	13-09-93
US-A-4592742	03-06-86	NONE	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 94/00483A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/85 A61K48/00 A61K39/12 A61K39/29

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,93 09236 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 13 Mai 1993	1,3,8, 24,25
Y	voir page 12, ligne 13 - ligne 15; revendications 6,38-43	2,4-7, 13,16, 17, 19-23, 26-31
Y	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.90, 1993, WASHINGTON US pages 4156 - 4160 WANG ET AL. cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	19,20, 22,23, 26-30

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## ° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 Août 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19-08-1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D



## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SCIENCES ET AVENIR, Septembre 1993, FR pages 22 - 25 P.CHAMBON cité dans la demande voir le document en entier ---	4
Y	DEVELOPMENT, vol.117, no.3, Mars 1993, CAMBRIDGE GB pages 947 - 959 LI Z ET AL 'DESMIN SEQUENCE ELEMENTS REGULATING SKELETAL MUSCLE-SPECIFIC EXPRESSION IN TRANSGENIC MICE' voir le document en entier ---	16,17
Y	WO,A,88 06185 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 25 Août 1988 voir page 18, ligne 1 - ligne 6; revendications 22-31 ---	2,4-6, 13,21
Y	WO,A,92 06212 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 16 Avril 1992 voir revendications 17-19 ---	20,23
Y	WO,A,93 17111 (THE WELLCOME FOUNDATION LTD.) 2 Septembre 1993 voir revendications 1-15 ---	7
Y	US,A,4 592 742 (SERGIO LANDAU) 3 Juin 1986 voir le document en entier -----	31

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No  
PCT/FR 94/00483

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9309236	13-05-93	US-A- 5298422 AU-A- 3124693 CA-A- 2122617 PT-A- 101042	29-03-94 07-06-93 13-05-93 28-02-94
WO-A-8806185	25-08-88	AU-A- 1391888 EP-A- 0301083 ZA-A- 8800970	14-09-88 01-02-89 10-08-88
WO-A-9206212	16-04-92	EP-A- 0502179	09-09-92
WO-A-9317111	02-09-93	AU-B- 3572593	13-09-93
US-A-4592742	03-06-86	AUCUN	